

Veränderungen des Ubiquitin-Proteasom-Systems im humanen Myokard  
bei ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Kristina Kellermann

Geburtsdatum / Geburtsort:

18.11.1988 in Düsseldorf

angefertigt an / in:

Universitätsklinik für Herzchirurgie der Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Michael Borger, MD PhD

Dr. rer. nat. Maja-Theresa Dieterlen

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 15.12.2020

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Kardiomyopathien	1
1.1.1	Dilatative Kardiomyopathie	4
1.1.2	Ischämische Kardiomyopathie	5
1.2	Kardiales Remodeling	6
1.3	Das Ubiquitin-Proteasom-System	8
1.3.1	Das Proteasom	9
1.3.2	Ubiquitin	10
1.3.3	E1-E2-E3-Enzymkomplex	10
1.3.4	Deubiquitinasen (DUBs)	12
1.4	Therapie	13
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
4.1	Probengewinnung	23
4.1.1	Probengewinnung bei LVAD-Implantation	23
4.1.2	Probengewinnung im Rahmen von Morrow-Resektionen	24
4.2	Verarbeitung der Proben	25
4.3	Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration	26
4.4	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
4.5	Western-Blot	28
4.6	Immunhistologische Färbungen	30
4.6.1	Ubiquitin-Färbung	30
4.6.2	Färbung des Apoptose-induzierenden Faktors AIF	31
4.6.3	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	31
4.7	Proteasomaktivitätsmessung	32
4.8	NADPH-Oxidase-Aktivitätsmessung	33
4.9	Statistik	34
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
5.1	Translation von Proteinen	35
5.2	Proteasomaktivität	36
5.3	Expression der E3-Ligasen	38

5.4	Ubiquitinierung	39
5.5	Oxidativer Stress und Apoptose	45
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>70</b>
	<b>Eigenständigkeitserklärung</b>	<b>71</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>72</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>73</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Herzmuskelerkrankungen, die mit mechanischen und elektrischen Dysfunktionen einhergehen können.<sup>1</sup> Diese Dysfunktionen führen zu ventrikulärer Hypertrophie oder Dilatation und haben verschiedene, zum Teil genetisch bedingte Ursachen. Kardiomyopathien können auf das Herz begrenzt oder Teil einer systemischen Erkrankung sein, die häufig zu progredienter Herzinsuffizienz oder kardiovaskulärem Tod führen.<sup>1</sup>

Die Klassifikation der Kardiomyopathien hat sich im Laufe der letzten drei Jahrzehnte stetig gewandelt. Beispielsweise wurden Kardiomyopathien 1980 in einem Bericht der Welt-Gesundheitsorganisation (WHO) als Herzmuskelerkrankung unbekannter Ursache definiert.<sup>2</sup> Eine weitere Definition der WHO von 1995 beschreibt Kardiomyopathien als Herzmuskelerkrankungen, die mit einer kardialen Dysfunktion einhergehen, und bezieht in diese Definition arrhythmogene rechts-ventrikuläre Kardiomyopathien (ARVC/D) und primär restriktive Kardiomyopathien ein.<sup>3</sup> Die *World-Heart-Federation* schlug 2013 eine Phänotyp-Genotyp-Nomenklatur vor. Diese MOGE(S)-Klassifikation beschreibt fünf Charakteristika von Kardiomyopathien: die Morphologie (M), die Beteiligung von Organen (O), die Genetik (G), die Ätiologie (E) und das Stadium der Herzinsuffizienz (S). Die Morphologie gibt erste Aussagen über die Diagnose, z. B. darüber, ob es sich um eine hypertrophe, arrhythmogene oder restriktive Kardiomyopathie handelt. Die aufgelisteten beteiligten Organe geben Auskunft darüber, ob nur das Herz oder zusätzlich noch ein anderes Organ betroffen ist. Die Genetik beleuchtet den zugrundeliegenden Erbgang und analysiert, ob eine Neumutation vorliegt. Die Ätiologie gibt zusätzliche Informationen über die genetische Ursache, z. B. das betroffene Gen. Das Stadium der Herzinsuffizienz ist eine optional Angabe, die für die Beschreibung von frühen Kardiomyopathien herangezogen werden kann, da bei frühen Kardiomyopathien die klinischen Kriterien häufig für eine genaue Charakterisierung nicht ausreichend sind, die genetischen Untersuchungen allerdings für eine Kardiomyopathie sprechen. Die Klassifikation hat sich aufgrund

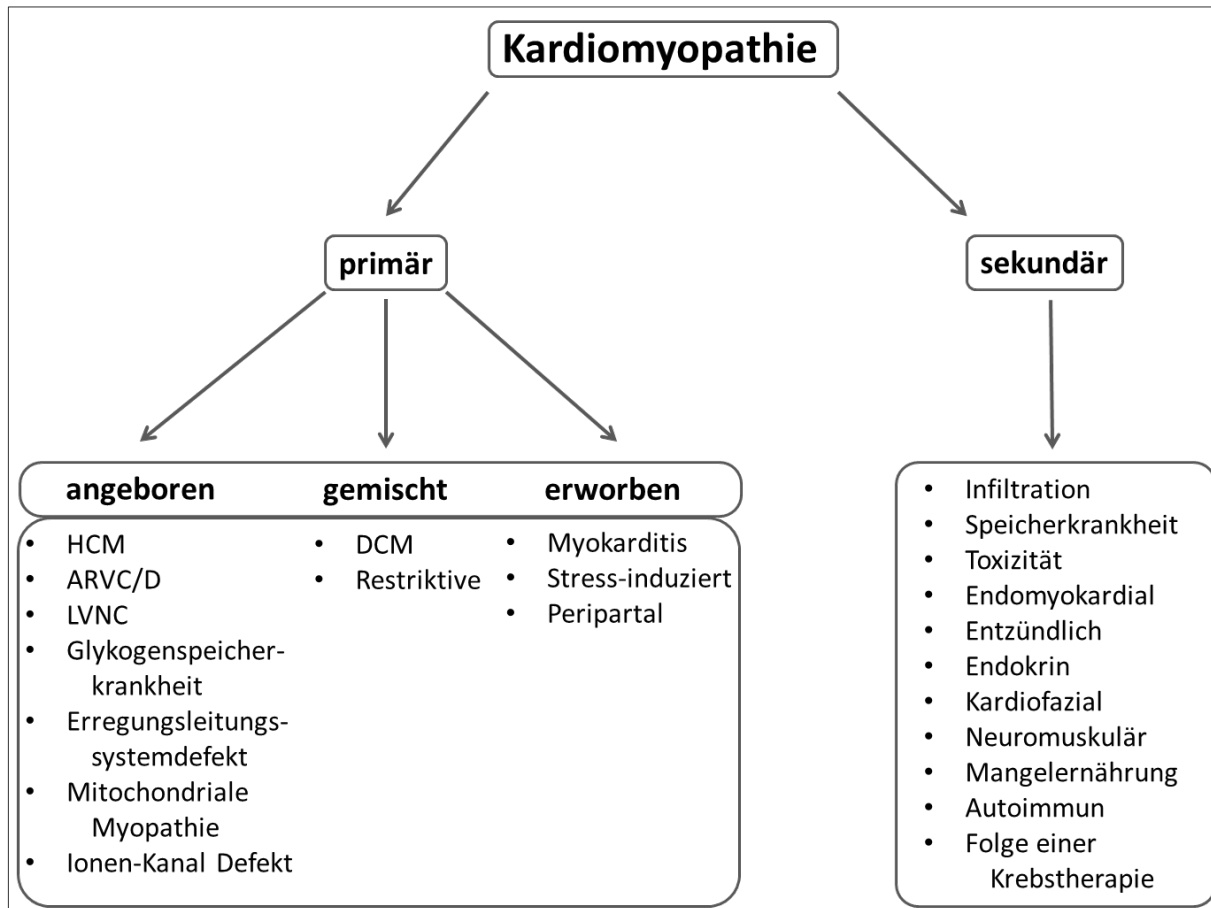


der zu geringen Tauglichkeit im klinischen Alltag und der fehlenden genetischen Diagnostik an vielen Standorten bisher nicht durchsetzen können.<sup>4</sup>

Im Folgenden wird eine Einteilung der Kardiomyopathien beschrieben, wie sie 2006 von der *American-Heart-Association* vorgestellt wurde.<sup>1</sup> In dieser Definition werden Kardiomyopathien in primäre und sekundäre Kardiomyopathien unterteilt (Abb. 1). Primäre Kardiomyopathien können angeboren, nicht-angeboren (gemischt) und erworben sein. Sie beschränken sich in erster Linie auf den Herzmuskel und sind relativ selten. Angeborene Kardiomyopathien, wie beispielsweise die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), Erregungsleitungssystemdefekte oder mitochondriale Myopathie werden durch Gendefekte hervorgerufen, sodass bei angeborenen Kardiomyopathien ein gehäuftes familiäres Auftreten zu beobachten ist.<sup>1</sup>

Die dilatative und restriktive Kardiomyopathie findet man familiär gehäuft, allerdings auch ohne familiären Bezug, sodass diese beiden als gemischte Kardiomyopathien eingeordnet werden.

Ursachen für erworbene Kardiomyopathien können eine Myokarditis, Stress, Schwangerschaft und auch Tachykardien sein. Aufgrund von entzündlichen Zellinfiltrationen kommt es bei der durch Myokarditis erworbenen Kardiomyopathie zur Bildung von interstitiellen Ödemen und Fibrose, die die physiologische Erregungsleitung verhindern.<sup>1</sup> Die stressinduzierte Kardiomyopathie, auch Tako-Tsubo-Kardiomyopathie genannt, wird durch eine akute, aber reversible, linksventrikuläre, systolische Dysfunktion beschrieben, ohne dass eine koronare Herzkrankheit (KHK) vorliegt. Bei der durch Schwangerschaft ausgelösten Kardiomyopathie handelt es sich um eine seltene, dilatative Form der Kardiomyopathie, die mit einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion und einer Herzinsuffizienz unbekannter Ursache einhergeht.<sup>1</sup> Für gewöhnlich manifestiert sich diese Kardiomyopathie im dritten Trimester der Schwangerschaft und tritt gehäuft bei adipösen, mehrgebärenden Frauen über 30 Jahren auf.<sup>1</sup> In 50% der Fälle erfolgt bei der peripartalen Kardiomyopathie nach sechs Monaten eine fast vollständige Genesung.<sup>1</sup>



**Abb. 1: Einteilung der Kardiomyopathieformen** (verändert nach <sup>1</sup>)

ARVC/D: arrhythmogene Rechts-Ventrikuläre Kardiomyopathien; DCM: dilatative Kardiomyopathie; HCM: hypertrophe Kardiomyopathie; LVCN: linksventrikuläre *non-compaction* Kardiomyopathie

Die primären Kardiomyopathien werden von anderen Formen der sekundären Dilatationen oder Dysfunktionen abgegrenzt, die durch andere kardiale oder systemische Prozesse entstehen (Abb. 1). Diese sekundären Kardiomyopathien werden nach den Krankheitsprozessen benannt, die ihnen zugrunde liegen. Sekundäre Kardiomyopathien zeigen eine pathologische Beteiligung des Herzmuskels als ein Teil von zahlreichen systemischen Erkrankungen.<sup>5</sup> Im Folgenden sollen die für diese Arbeit relevanten Kardiomyopathieformen genauer charakterisiert werden.

### 1.1.1 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine Herzmuskelerkrankung, die mit einer ventrikulären Dilatation und einer beeinträchtigten systolischen Pumpfunktion einhergeht.<sup>5</sup> Die DCM tritt mit einer Prävalenz von 1:2500 auf und ist die dritthäufigste Ursache für eine Herzinsuffizienz und die häufigste Ursache für Herztransplantationen.<sup>1</sup> Die DCM führt zu progredienter Herzinsuffizienz, einer Abnahme der linksventrikulären Kontraktion, ventrikulären und supraventrikulären Arrhythmien und plötzlichem Herztod.<sup>1</sup> Laut einer Definition der WHO ist eine DCM zu diagnostizieren, wenn die Ejektionsfraktion  $< 45\%$  oder der linksventrikuläre Durchmesser am Ende der Diastole  $> 117\%$  ist.<sup>5</sup>

20-48% der DCM-Erkrankungen wurden als familiengebundene Erkrankung gemeldet und als familiäre DCM (FDC) bezeichnet.<sup>5</sup> Der Genotyp für die angeborene DCM ist sehr heterogen und wird autosomal dominant vererbt. In einigen Fällen liegt die Mutation in einem Gen, das für Lamin A/C kodiert. Patienten, die an dieser mutationsbedingten DCM leiden, weisen eine geringe Dilatation auf, haben aber eine schwere Dysfunktion des linken Ventrikels, Erregungsleitungsstörungen, supraventrikuläre Arrhythmien, variable Skelettmuskelbeteiligung und variable Serumkonzentrationen der Kreatin-Kinase.<sup>5</sup> Außerdem kommen auch X-chromosomal vererbte DCM-Fälle vor, in denen die Mutation das Dystrophin-Gen betrifft und die Patienten eine erhöhte Aktivität der Kreatin-Kinase und muskuläre Abnormalitäten aufweisen.<sup>5</sup> Eine FDC ist zu diagnostizieren, wenn mehr als zwei weitere Verwandte eines DCM-Patienten unter den genannten Symptomen leiden oder wenn ein Verwandter eines an DCM erkrankten Patienten vor seinem 35. Lebensjahr unerwartet am plötzlichen Herztod verstirbt.<sup>5</sup> An DCM leidende Patienten haben durch die Volumenüberlastung oder die geringe Auswurfleistung Symptome einer Herzinsuffizienz, wie beispielsweise Dyspnoe, Schwindel und Palpitationen. 20-35% der Patienten klagen über Brustschmerzen unter Belastung oder leiden am Fatigue-Syndrom.<sup>5</sup> Zur Diagnostik einer DCM zählen eine ausführliche Familienanamnese, eine physische Anamnese mit besonderer Beachtung der neuromuskulären Aktivität sowie elektro- und echokardiographische Untersuchungen. Die pharmakologische Therapie erfolgt mit einer großen Bandbreite an Medikamenten, beispielsweise

*Angiotensin-converting-enzyme*-Hemmer (ACE-Hemmer), Beta-Blocker und Diuretika. Bei fortgeschrittener Symptomatik wird ein biventrikulärer Schrittmacher oder ein Linksherzunterstützungssystem (LVAD) implantiert.<sup>5</sup>

### 1.1.2 Ischämische Kardiomyopathie

Die ischämische Kardiomyopathie (ICM) ist definiert als eine linksventrikuläre Dysfunktion, die als Folge einer Minderdurchblutung aufgrund einer koronaren Herzkrankheit (KHK) oder eines Myokardinfarktes auftritt.<sup>6</sup> Die Stenose muss hierbei bis zu 75% der herzversorgenden Gefäße betreffen.<sup>7</sup> Der Ersatz von Herzmuskelgewebe umfasst den Ersatz von Herzmuskelgewebe durch Bindegewebe, was zu einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion und einer Dilatation der betroffenen Herzkammer führt. Die Ejektionsfraktion beträgt nur noch < 35-40%.<sup>8</sup> Einer Untersuchung zufolge verlieren humane Kardiomyozyten ihre Sarkomere, das sarkoplasmatische Retikulum und die T-Tubuli fast vollständig. Die Anzahl der Glykogenablagerungen ist dagegen erhöht.<sup>7</sup> Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind ein ATP-Verlust und eine verringerte Sensitivität für Calcium und freie Sauerstoff-Radikale. Dies führt zu einer abnormalen Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums.<sup>7</sup> Zu den häufigsten Symptomen einer ICM gehören Husten, Fatigue, unregelmäßiger und schneller Puls sowie Palpitationen, Kurzatmigkeit und Ödembildung.<sup>9</sup> Zur Diagnostik werden wie bei anderen Kardiomyopathien EKG, Magnetresonanztomografie und Katheterisierung verwendet.<sup>9</sup> Die pharmakologische Behandlung einer ICM erfolgt durch eine Abschwächung des Sympathikuseinflusses auf das Herz und einer Inhibierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch *Angiotensin-converting-enzyme*-Hemmer (ACE-Hemmer).<sup>7</sup>

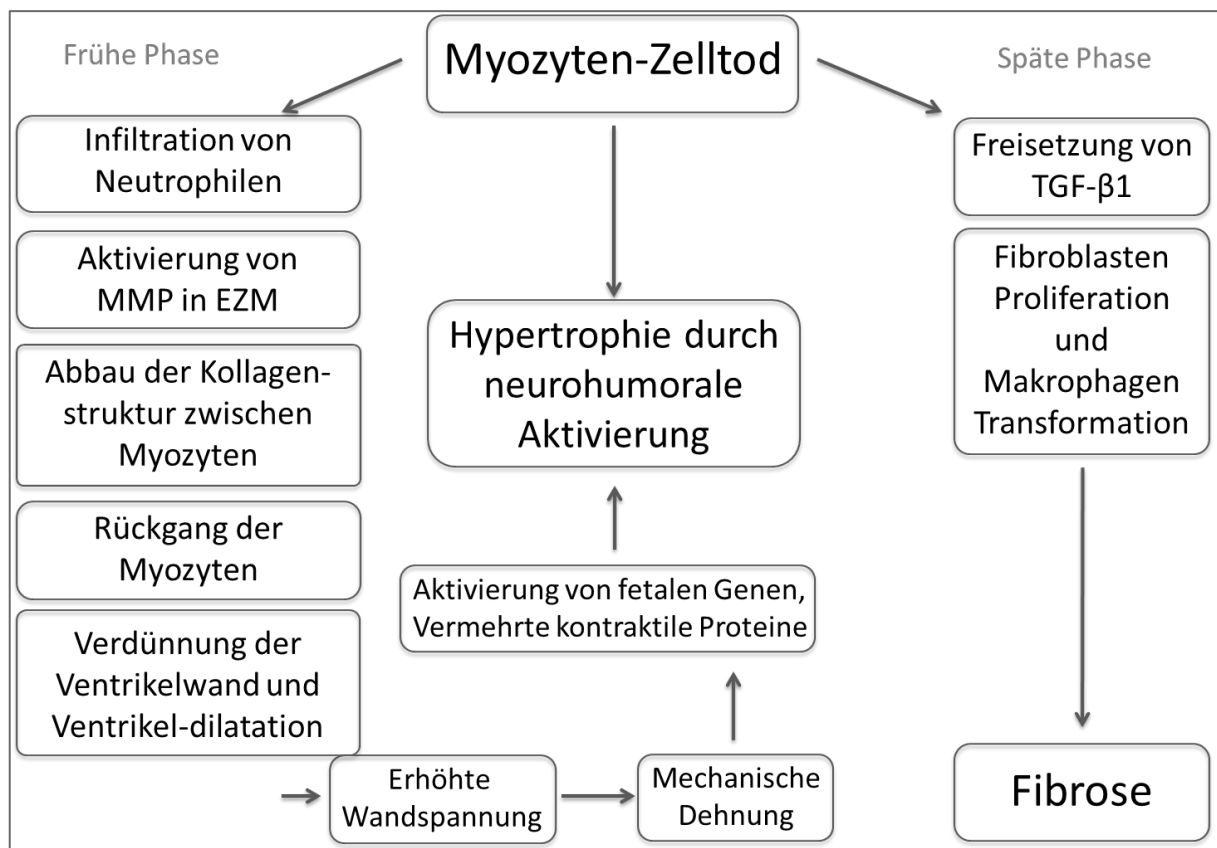
## 1.2 Kardiales Remodeling

Unter dem Begriff kardiales Remodeling werden reaktive Umbauprozesse des Ventrikelmyokards zusammengefasst, die als Spätfolge eines Herzinfarktes auftreten und Fibrose, Hypertrophie und Ventrikeldilatation zur Folge haben können. Die morphologischen Veränderungen gehen mit einer Verminderung der Ejektionsfraktion und einer Störung der Erregungsleitung durch eine Verminderung der *Gap junctions* einher und können in einer progredienten Herzinsuffizienz münden.<sup>10</sup> Kardiales Remodeling ist ein Prozess, der auch unter physiologischen Bedingungen, z. B. bei Ausdauerathleten nachgewiesen werden konnte.<sup>1</sup>

Kardiales Remodeling ist von klinischer Bedeutung. Eine linksventrikuläre Dilatation kann als nichtinvasives Maß des linksventrikulären Remodelings gewertet werden. Auch bei asymptomatischen Patienten war eine Dilatation nach einem Myokardinfarkt mit der Entwicklung einer chronischen Linksherzinsuffizienz, dem Auftreten von Herzrhythmusstörungen und dem vorzeitigen plötzlichen Herztod verbunden.<sup>11</sup> Das kardiale Remodeling umfasst komplexe Transkriptions-, Signalleitungs-, elektrophysiologische und strukturelle Vorgänge. Hypertrophiebedingte Stimuli induzieren und regulieren Gene für Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise für sarkomerische Proteine, *Transforming-Growth-Factor 1 $\beta$*  (TGF-1 $\beta$ ) und natriuretische Peptide.<sup>12</sup> Hinzu kommen eine Reihe weiterer zelluläre Prozesse wie Fibrose, vaskuläre Steifigkeit, endotheliale Dysfunktion und Entzündungsreaktionen, die das Remodeling begünstigen.<sup>13</sup>

75% aller Herzinsuffizienz-Patienten leiden an einer vorangegangenen Hypertonie.<sup>14</sup> Da die ausdifferenzierten Myozyten den Zellzyklus nicht mehr durchlaufen, vergrößern sie sich, um den hohen Druck auf die Ventrikelwand ausgleichen zu können. Diese Hypertrophie führt zu einer Verdickung und Versteifung der Ventrikelwand. Eine hypertrophierte Ventrikelwand verringert die Wandspannung und den hohen Sauerstoffbedarf kurzfristig. Wenn der druckinduzierte Stress langanhaltend bestehen bleibt, kommt es zu einer Dekompensation des Myokards und zu klinischem Herzversagen. Dieser Übergang von adaptiver Hypertrophie zum Herzversagen ist bis heute unverstanden.<sup>13</sup>

Prozesse, die zu ventrikulärem Remodeling führen, beinhalten den Verlust von Kardiomyozyten durch Nekrose, Apoptose oder Autophagie.<sup>13</sup>



**Abb. 2: Einteilung des kardialen Remodelings in eine frühe und in eine späte Phase.**

EZM: Extrazelluläre Matrix; MMP: Matrix-Metallproteinasen; TGF-1β: *Transforming growth factor beta 1β*

Auch nach Infarktereignissen können Remodeling-Prozesse auftreten. Der Ischämiegrad des beschädigten Myokards im linken Ventrikel sowie dessen Lokalisation beeinflussen das Maß des linksventrikulären Remodelings. Das Remodeling nach einem Infarkt wird in eine frühe und in eine späte Phase unterteilt (Abb. 2). In der frühen Phase, die bis 72 Stunden nach dem Infarkt andauert, wird die Kollagenstruktur zwischen den Kardiomyozyten durch Serinproteasen und die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen, die von neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden, abgebaut. Dies führt zu einer Verdünnung der Ventrikelwand und einer Dilatation des Ventrikels sowie zu einem Anstieg der während der Systole und Diastole auftretenden Wandspannung.<sup>12</sup>

Während der späten Phase des Remodeling kommt es zu einer Myozyten-Hypertrophie und zu Umbauprozessen des Ventrikels. Die Umbauprozesse dienen einer gleichmäßigeren Verteilung der erhöhten Wandspannung, während die extrazelluläre Matrix eine Kollagennarbe bildet, die weitere Deformationen verhindert aber auch die Elastizität einschränkt.<sup>12</sup> Im weiteren Verlauf wird ein Prozess induziert, durch den die mechanischen Kräfte das gestresste Gewebe weiter dehnen. Dadurch entsteht ein geweiteter Ventrikel mit einer unnatürlich hohen Wandspannung und einem ineffizienten Kontraktionsvermögen.<sup>13</sup>

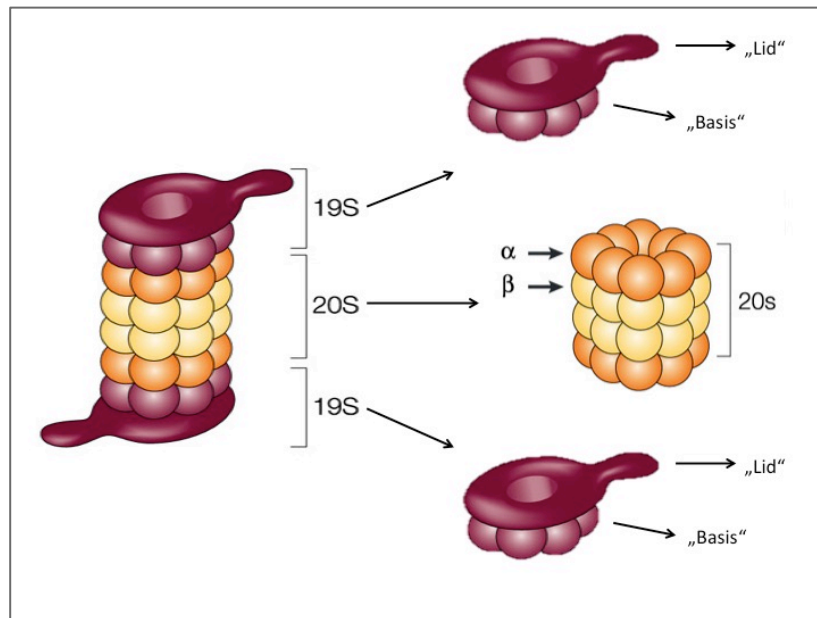
### **1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System**

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist der Hauptabbauweg für intrazelluläre Proteine. Etwa 90% aller Proteine in Säugerzellen werden durch das UPS abgebaut, wodurch sichergestellt wird, dass oxidierte, beschädigte oder fehlerhaft gefaltete Proteine ihre intrinsische Toxizität nicht entfalten können.<sup>15</sup> Das UPS besteht aus vier Komponenten: dem Proteasom, dem Ubiquitin, dem E1-E2-E3-Enzymkomplex und den Deubiquitinasen (DUBs). Das UPS spielt bei kardialen Remodeling-Prozessen, die infolge von Kardiomyopathien auftreten, eine entscheidende Rolle. Studien zeigen einen erhöhten Anteil ubiquitinerter Proteine und Ubiquitin-positiver Aggregate im humanen insuffizienten Myokard.<sup>16</sup> Außerdem zeigt eine Studie bei Patienten mit DCM, dass Ubiquitin und Myosin im Myokardgewebe in großen Aggregaten kolokalisiert sind.<sup>17</sup> Die verschiedenen Komponenten des UPS sind in humanem Gewebe von Patienten mit Kardiomyopathien bisher nicht quantifiziert. Diese Quantifizierung ist jedoch eine notwendige Grundlage, um den Fortschritt des kardialen Remodelings zurückverfolgen zu können und somit mögliche Interventionszeitpunkte für die Inhibition des kardialen Remodelings bzw. für die Induktion des reversen kardialen Remodelings festlegen zu können.

### 1.3.1 Das Proteasom

Ein funktionsfähiges Proteasom setzt sich aus einer katalytischen 20S-Untereinheit und einer respektive zwei 19S-Untereinheiten zusammen. Das Proteasom hat eine Fassstruktur, die aus zwei Ringpaaren mit je 7 Untereinheiten besteht. Die  $\beta$ -Ringe der 20S-Untereinheit besitzen die proteolytische Aktivität und bilden die  $\beta_1$ - (Caspase), die  $\beta_2$ - (Trypsin-ähnliche) und die  $\beta_5$ - Untereinheiten (Chymotrypsin-ähnliche). Diese drei Untereinheiten können durch die Isoformen  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$  und  $\beta_{5i}$  ersetzt werden. Auf den  $\beta$ -Ringen sitzen zu beiden Seiten die  $\alpha$ -Ringe. Diese besitzen keine proteolytische Aktivität. Die Untereinheiten der  $\alpha$ -Ringe  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  und  $\alpha_7$  sind für die Bildung einer Öffnung am jeweiligen Ende des Proteasoms verantwortlich. Wenn die  $\alpha$ -Untereinheiten aktiviert werden, ziehen sich die Aminoenden der entsprechenden Untereinheit zurück und ermöglichen dem Substrat den Zugang zur Kammer.<sup>18</sup> An jedem Ende der Fassstruktur sitzt die regulatorische 19S-Untereinheit, welche in ein *Lid* und eine *Basis* eingeteilt werden kann (Abb. 3). Durch die Bindung einer 19S-Untereinheit an eine Seite des Proteasoms entsteht ein 26S-Proteasom in Pilz-Konfiguration. Durch die Bindung von zwei 19S-Untereinheiten an je eine Seite des Proteasoms entsteht ein 30S-Proteasom in einer Hantel-Konfiguration.<sup>19</sup> Die 19S-Untereinheit besteht wiederum aus zwei Subkomplexen. Die *Basis* besteht aus sechs Untereinheiten, die ATPase-Aktivität besitzen und ringförmig angeordnet sind. Die ATPase-Aktivität dient der Substratentfaltung und der Aktivierung und Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheiten.<sup>20</sup> Das *Lid* besteht aus neun Untereinheiten, von denen eine Untereinheit die Hauptbindungsdomäne für Ubiquitin besitzt.<sup>19</sup>





**Abb. 3: Die einzelnen Komponenten eines Proteasoms** (verändert nach <sup>21</sup>)

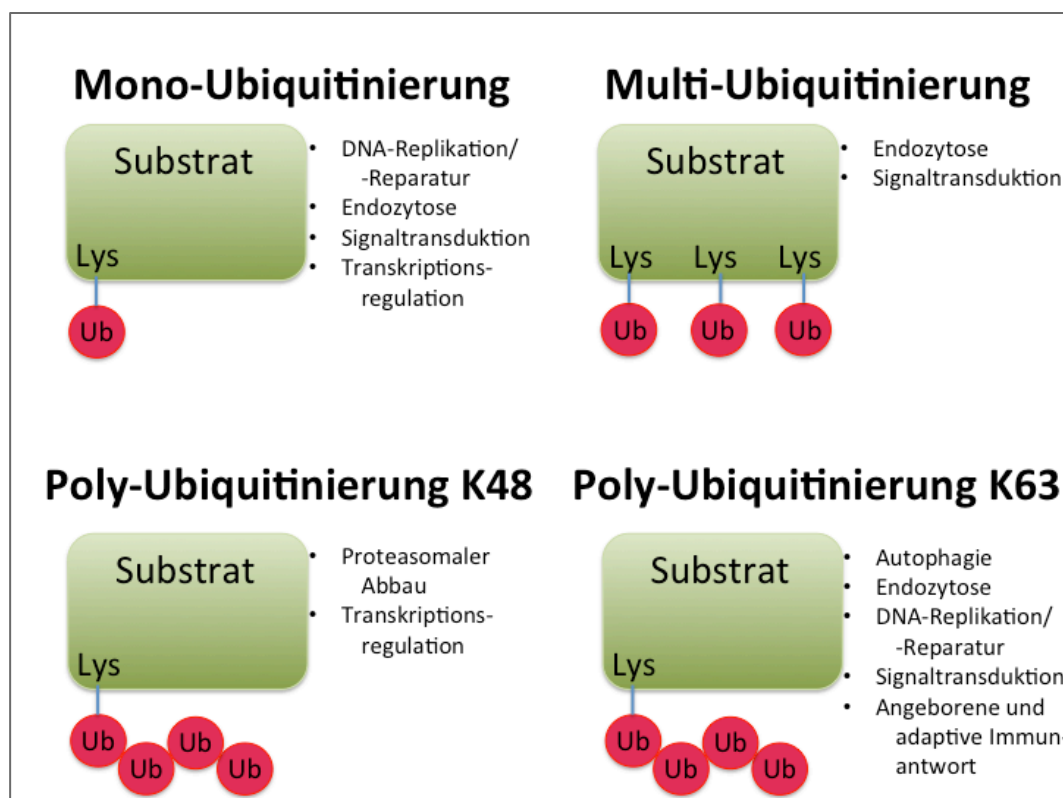
### 1.3.2 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein kleines, globuläres, hochkonserviertes Protein, das aus 76 Aminosäuren besteht und eine Molekülmasse von 8kDa besitzt.<sup>22</sup> Gideon Goldstein hat es im Jahre 1975 erstmals beschrieben.<sup>23</sup> Bis heute sind vier Gene im humanen Genom bekannt, die für Ubiquitin kodieren: UBB, UBC, UBA52 und UBA80.<sup>24</sup> Ubiquitin wird an die primäre Aminogruppe des Zielproteins übertragen, um dieses posttranslational zu verändern.

### 1.3.3 E1-E2-E3-Enzymkomplex

Die Ubiquitinierung eines Proteins erfolgt energieabhängig und mehrschrittig über eine Enzymkaskade, an deren Ende ein Ubiquitin an das Aminoende eines Lysinrestes übertragen wird. Im ersten Schritt bindet ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) ATP und Ubiquitin und katalysiert unter ATP-Verbrauch die Adenylierung des Carboxy-Terminus des Ubiquitins. Ein reaktiver Cysteinrest des Enzyms E1 formt anschließend mit dem adenylierten Ubiquitin die aktivierte Form des E1-Ubiquitin-Thioester-Komplexes. Im Menschen konnten bis heute acht verschiedene E1-Enzyme gefunden

werden. Im zweiten Schritt transferiert E1 das aktivierte Ubiquitin auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2). Über einen hochkonservierten Cysteinrest des E2 wird eine stark energetische Bindung zwischen dem Ubiquitin und E2 gebildet. Bisher wurden 35 verschiedene E2-Enzyme identifiziert, die eine wesentliche Rolle bei der Ubiquitinbindung spielen. Im letzten Schritt der Enzym-Kaskade bindet der E2-Ubiquitin-Komplex an ein Ubiquitin-Ligase-Enzym (E3). Die E3-Enzyme rekrutieren ein spezifisches Substrat und dienen als Gerüst für die Übertragung des Ubiquitins vom E2-Ubiquitin-Komplex auf das jeweilige Substrat. Bislang sind über 600 hochspezifische E3-Ligasen bekannt<sup>25</sup>, wobei im Herzmuskel die muskelspezifischen E3-Ligasen *Muscle atrophy F-box* (MAFbx) und *Muscle RING-finger protein-1* (MuRF1) beteiligt sind. Die E3-Ligasen werden in zwei Gruppen unterteilt: Die Homologe zu E6-AP-COOH-Terminus (HECT)-Ligasen verfügen über einen konservierten Cysteinrest, mit dem sie eine Thioesterbindung mit dem Carboxy-Terminus des aktivierten Ubiquitins ausbilden, bevor das Substrat ubiquitiniert wird. Die *Really Interesting New Gene* (RING)-Ligasen agieren als Gerüste, indem sie das aktivierte Ubiquitin und das Substrat gleichzeitig binden und den Carboxy-Terminus des Ubiquitins mit der  $\epsilon$ -Amino-Gruppe des Substrats verbinden.<sup>26</sup>



**Abb. 4: Schematische Übersicht der verschiedenen Ubiquitinierungsarten.** Lys: Lysin; Ub: Ubiquitin

Proteine können an einem einzigen Lysinrest monoubiquitiniert, an mehreren Lysinresten multiubiquitiniert oder mit Ubiquitinketten polyubiquitiniert werden (Abb. 4). Das Ubiquitin selbst enthält sieben Lysine (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 und Lys63), die alle (poly)ubiquitiniert werden können, wobei die Ubiquitinierung meist am Lys48 oder Lys63 erfolgt.<sup>19</sup> E2-Enzyme beeinflussen die Bindung des Ubiquitins zwischen einem der sieben Lysinreste des Ubiquitins und dem Substrat und legen damit den Abbauweg für das jeweilige Substrat fest.<sup>27</sup> Während eine Ubiquitinierung am Lys48 das Substrat für den proteasomalen Abbau markiert, ist die Lys63-Ubiquitinierung mit Autophagie-assoziiertem Proteinabbau verknüpft.<sup>28,29</sup>

#### **1.3.4 Deubiquitinasen (DUBs)**

Deubiquitinasen (DUBs) sind Enzyme, die Ubiquitin von Proteinen entfernen und auf diese Weise den proteasomalen Abbau und die Aktivität regulieren.<sup>30</sup> DUBs kehren die von E3-Ligasen induzierte Ubiquitinierung um. Im humanen Genom gibt es ca. 100 verschiedene DUBs, die abhängig von ihrer Struktur oder Sequenz in fünf Untergruppen unterteilt werden können: Ubiquitin-spezifische Proteasen (USPs), Ubiquitin-Carboxy-terminale Hydrolasen (UCHs), Ovarialer-Tumor-Proteasen (OTUs), Machado-Joseph-Krankheit-Proteasen (MJDs) und JAMM-Motiv-Proteasen.<sup>31</sup> Über 90% der bereits identifizierten DUBs sind Cystein-Proteasen, deren katalytisches Zentrum konservierte Cystein-, Histidin- und Aspartat-Reste enthalten.<sup>32</sup>

## 1.4 Therapie

Das Ubiquitin-Proteasom-System spielt eine zentrale Rolle bei fortgeschrittener Kardiomyopathie und schwerer Herzinsuffizienz. Die Ultima Ratio-Therapie ist bis heute die Herztransplantation. Im Jahre 2017 wurden laut der Deutschen Stiftung für Organtransplantation deutschlandweit 257 Herztransplantationen vorgenommen und 440 Patienten für eine Herztransplantation angemeldet.<sup>33</sup> Am Jahresende 2017 standen laut Eurotransplant noch immer 724 Patienten auf der Warteliste für ein Spenderherz. Die durchschnittliche Wartezeit auf ein Spenderherz beträgt 18 Monate. Die Hauptindikation für eine Herztransplantation ist mit ca. 70% die Kardiomyopathie, gefolgt von der Chronisch-ischämischen Herzkrankheit mit ca. 20%.<sup>33</sup> Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Spenderherzen, ist die Suche nach Alternativen von außerordentlicher Wichtigkeit, um Patienten mit fortgeschrittener Kardiomyopathie und schwerer Herzinsuffizienz ein Überleben zu ermöglichen. Die Anlage eines Linksherzunterstützungssystem (LVAD) ist eine mögliche Behandlungsmethode. Dieses Unterstützungssystem führt zu einer Verbesserung des klinischen Zustandes des Patienten und einer Entlastung der Myozyten. Durch die ventrikuläre Entlastung werden Prozesse angestoßen, die als reverses Remodeling bezeichnet werden.<sup>34</sup> Bei Patienten, bei denen ein reverses Remodeling nachgewiesen wurde, konnte man außerdem eine Veränderung der Expression des sarkoplasmatischen 20S Proteasoms beobachten.<sup>35</sup> Dies lässt darauf schließen, dass das UPS eine zentrale Rolle im reversen Remodeling-Prozess spielt. Jedoch ist der Grad der Erholung limitiert und die Gene und Proteine, die zum Erfolg des LVAD beitragen, sind weitgehend unbekannt.

Eine weitere neue Behandlungsmethode ist die Verwendung von biologischem Material, das auch als *biologic LVAD* bezeichnet wird.<sup>34</sup> Dieses Material wird eingesetzt, um den Ventrikel zu entlasten und greift somit direkt in die Herzmechanik ein. Ein Beispiel hierfür ist Algisyl, ein Hydrogel, das aus braunen Meeresalgen gewonnen wird und bereits gute Erfolge bei behandelten Patienten verzeichnen konnte. In einer klinischen Studie wurde Patienten zusätzlich zu ihrer Standardmedikation Algisyl verabreicht. Es zeigte sich eine Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit, eine geringere Rate an anhaltenden ventrikulären Arrhythmien sowie eine

weniger ausgeprägte Verschlechterung der Herzinsuffizienz.<sup>36</sup> Bisher konnte kein Einfluss auf das UPS nachgewiesen werden, jedoch ist eine Zusammenhang durchaus denkbar, da man bereits einen Zusammenhang zwischen mechanischer Ventrikelentlastung und dem UPS nachgewiesen hat.<sup>35</sup>

Um mögliche neue Therapiestrategien für Kardiomyopathien und schwerer Herzinsuffizienz zu entwickeln, ist es deshalb von zentraler Bedeutung das UPS im humanen Myokard zu charakterisieren, um die Zusammenhänge zwischen dem UPS und der Herzmechanik genauer zu verstehen und auf diese therapeutisch einwirken zu können.

## **2 Zielsetzung**

Das UPS spielt eine zentrale Rolle bei kardialen Remodelingprozessen, die infolge von Kardiomyopathien und schwerer Herzinsuffizienz auftreten können. Die Ultima Ratio-Therapie ist bis heute die Herztransplantation. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Spenderherzen ist die Suche nach Alternativen von außerordentlicher Wichtigkeit. Um mögliche neue Therapiestrategien für Kardiomyopathien und schwere Herzinsuffizienz zu entwickeln, ist es deshalb von zentraler Bedeutung das UPS im humanen Myokard zu charakterisieren, um die Zusammenhänge zwischen dem UPS und der Herzmechanik genauer zu verstehen und auf diese therapeutisch einwirken zu können. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig das UPS bei fortgeschrittener ICM und DCM, den beiden häufigsten Indikationen für eine Herztransplantation, untersucht. Dabei sollen die verschiedenen Komponenten des UPS, das Proteasom, das Ubiquitin und die Ubiquitylierungsmaschinerie sowie herzspezifische E3-Ligasen der E1-E2-E3-Enzymkaskaden analysiert werden. Eine Kontrollgruppe ermöglicht dabei, die Unterschiede zu ICM- und DCM-geschädigtem Myokard zu identifizieren. Des Weiteren soll ermittelt werden, wie hoch die ROS-Produktion sowie die Apoptoserate im genannten Gewebe ist. Ziel der Arbeit ist es, den Ist-Zustand des UPS in Kardiomyopathie-geschädigtem Gewebe festzustellen sowie mögliche Unterschiede in den Änderungen des UPS bei ICM und DCM zu erfassen.

### 3 Material

**Tab. 1: Geräte**

Gerät/Bezeichnung	Firma	Ort
PerfectBlue™ 'Semi-Dry'-Elektroblotter	PEQLAB Biotechnologie GMBH	Erlangen, Deutschland
Heraeus FUNCTION Line Brutschrank	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts/USA
Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH	Oberschleißheim, Deutschland
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH	Isernhagen, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Eberstadt, Deutschland
Folienschweißgerät	Severin	Sundern, Deutschland
Fusion Solo S	Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland
Gefrierschrank	Robert Bosch GmbH	Gerlingen- Schillerhöhe, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell, Mini Trans-Blot Module, and PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Elektrophorese-System	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Einbettautomat	Slee Medical	Mainz, Deutschland
Eppendorf® Thermomixer comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling/Berzdorf, Deutschland
Kühlplatte	Medite GmbH	Burgdorf, Deutschland
Kühlschrank	Robert Bosch GmbH	Gerlingen- Schillerhöhe, Deutschland
-80°C Tiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts/USA
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG	Schwabach, Deutschland
Mikrowelle	Severin	Sundern, Deutschland
Schnittmikrotom	Microm International GmbH	Walldorf, Deutschland
Photometer	Perkin Elmer	Norwalk CT, USA
pH-Meter InoLab	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH	Weilheim, Deutschland
Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Germany
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH	Ortenberg, Deutschland

Gerät/Bezeichnung	Firma	Ort
Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
Vortex Mixer	Gemmy industrial Corp.	Taipei, Taiwan
Paraffinstreckbad	Medax Nagel GmbH & Co. KG	Neumünster, Deutschland
Heraeus Bifuge Stratos	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts/USA
Eppendorf® Zentrifuge 5417R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling/Berzdorf, Deutschland
Sprout® Mini Zentrifuge 12V	Heathrow® Scientific	Vernon Hills, USA

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Material/Bezeichnung	Firma	Ort
Autoklavierband	VP- Group	Feuchtwangen, Deutschland
Gel Blot Paper	VWR International GmbH	Dresden, Deutschland
Deckgläser 24x0 mm, 24x60 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)	Cellstar Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Dako Pen (Fettstift)	Dako	Glostrup, Dänemark
Mikroliterspritze	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Microtome Blades	Feather Safety Razor Co.	Osaka, Japan
SUPERFROST® PLUS Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts/USA
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling, Berzdorf, Deutschland
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf Research	Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Skalpell	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland
Timer	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Untersuchungs-Handschuhe	Rösner-Mautby Meditrade GmbH	Kiefersfelden, Deutschland
Wiegeschalen	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
96-Well Platte	Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz

Tab. 3: Chemikalien und kommerzielle Kits

Chemikalien und Kits/ Bezeichnung	Firma	Ort
Bovines Serumalbumin	SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH	Steinheim, Deutschland
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts/ USA
Cytochrom C ≥ 95% für die Biochemie	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts/ USA
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts/ USA
Ethanol vergällt ≥ 99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Glycerol Gelatin	SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH	Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Meyer	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 37%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Methanol > 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
NaOH ≥ 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
NADPH-Tetranatriumsalz ≥ 97%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Proteinmarker IV	PEQLAB Biotechnology GmbH	Erlangen, Deutschland
Roti-Block-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
SDS ultra pure ≥ 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
TRIS PUFFERAN® > 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100	SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH	Steinheim, Deutschland
Tween® 20	SIGMA-ALDRICH® CHEMIE GmbH	Steinheim, Deutschland
Xylol (Isomere) ≥ 98% rein, für Histologie	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland



**Tab. 4: Primärantikörper für die immunhistologischen Färbungen und Western-Blots**

Primärantikörper	Hersteller	Bestellnummer	Lagerung
Anti-Multi-Ubiquitin (mouse monoclonal)	MBL, Biozol	DO58-3	-20°C
Anti-Ubiquitin (linkage-specific K48) antibody (rabbit monoclonal)	Abcam	ab140601	-20°C
Anti-Ubiquitin (linkage-specific K63) antibody (rabbit monoclonal)	Abcam	Ab179434	-20°C
Anti-MAFbx (rabbit monoclonal)	Eurogentec	(MAFbx generated in rabbits against the following peptide CYPRKEQYGDTLQL )	-20°C
Anti-MURF1 antibody (rabbit polyclonal)	Abcam	ab183094	-20°C
Anti-eIF4E (rabbit polyclonal)	Santa Cruz Biotechnology	sc13963	-20°C
Anti-GAPDH (mouse monoclonal)	HyTest	5G4 Mab 6C5	4°C

**Tab. 5: Sekundärantikörper für die immunhistologischen Färbungen und Western-Blots**

Sekundärantikörper	Hersteller	Bestellnummer	Lagerung
Anti-rabbit-Biotin konjugiert	Sigma-Aldrich®	B8895	-20°C
Streptavidin-HRP	Thermo Fisher	21124	-20°C
Anti-Rabbit IgG-HRP konjugiert	Sigma-Aldrich®	A9169	-20°C
Anti-Mouse IgG-HRP konjugiert	Sigma-Aldrich®	A9044	-20°C

**Tab. 6: Primärantikörper und Sekundärantikörper und Verdünnung für den Western-Blot**

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Multi-Ubiquitin (MBL, Biozol D058-3)	1:1.000	Rabbit-anti-mouse IgG-POD conjugated (Sigma, A9044)	1:5.000
Anti-Ubiquitin (linkage-specific K48) antibody (Abcam, ab140601)	1:1.000	Goat-anti-rabbit-Biotin (Sigma, B8895)	1:20.000
		Streptavidin-HRP (Thermo Fisher, 21124)	1:2.000
Anti-Ubiquitin (K63) (Abcam, ab179434)	1:1.000	Goat-anti-rabbit-Biotin (Sigma, B8895)	1:20.000
		Streptavidin-HRP (Thermo Fisher, 21124)	1:2.000
Anti-MAFbx	1:1.000	Goat-anti-rabbit IgG-Peroxidase conj. (Sigma, A9169)	1:5.000
Anti-MuRF1 (Abcam, ab183094)	1:1000	Goat-anti-rabbit-Biotin (Sigma, B8895)	1:20.000
		Streptavidin-HRP (Thermo Fisher, 21124)	1:2.000
Anti-eIF4E (Santa-Cruz, sc13963)	1:200	Goat-anti-rabbit IgG-Peroxidase conj. (Sigma, A9169)	1:5.000
Anti-GAPDH (HyTest, 5G4 Mab 6C5)	1:5.000	Goat-anti-mouse IgG-Peroxidase conj. (Sigma, A9044)	1:5.000

**Tab. 7: Primärantikörper mit Sekundärantikörper und Verdünnung für die immunhistologischen Färbungen**

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Multi Ubiquitin antibody BL-DO58-3, Biozol, (mouse monoclonal)	1:50	Rabbit-anti-mouse IgG-Peroxidase konjugiert	1:400
Rabbit-anti AIF (Santa Cruz, #sc5586) (rabbit polyclonal)	1:80	Dako Envision Detection System (Dako, #K5007)	-

Tab. 8: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10% APS	1g $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ add. Aqua dest.
4% Formalin/PBS-Lösung	10,8% Formaldehyd (37%) in 1× PBS
Krebs-Henseleit-Stocklösung	118 mM NaCl 4,7 mM KCl 1,6 mM $\text{CaCl}_2$ 1,2 mM $\text{MgSO}_4$ 1,2 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,2 mM $\text{NaHCO}_3$ 25 mM D-Glucose pH 7,2 – 7,4
Krebs-Henseleit-Lösung	800 µl Krebs-Henseleit-Stocklösung 40 mg Glucose 42,8 mg Natriumbicarbonat add. Aqua dest.
5× Laemmli-Puffer	0,5 M Tris 10% SDS 50% Glycerol 25% $\beta$ -Mercaptoethanol 0,05% Bromphenolblau add. Aqua dest. pH 6,8
5% Magermilch-Lösung	5% Magermilchpulver in 1× TBST
1% PMSF-Stammlösung	1% PMSF in 99,5% Ethanol
Ponceau-Lösung	0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure
Proteasom-Aktivitäts-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA 2 mM ATP 20% Glycerin 4 mM Di-Thiothreitol add. Aqua dest. pH 7,5
RIPA-Stocklösung	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 1 mM EGTA 1% NP-40 1% Natriumdeoxycholat 2,5 mM Natriumpyrophosphat 1 mM $\beta$ -Glycerophosphat 1 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 1 µg/ml Leupeptid pH 7,5

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
RIPA-Lysepuffer	RIPA-Stocklösung 1% Protease/Phosphatase-Inhibitor 1% EDTA 1 mM PMSF
Relaxing Buffer-Stocklösung	90 mM HEPES 126 mM KCl 36 mM NaCl 1 mM MgCl 50 mM EGTA 8 mM ATP 10 mM Creatinphosphatate add. Aqua dest.
Relaxing Buffer-Lysepuffer	Relaxing Buffer-Stocklösung 1% Protease/Phosphatase-Inhibitor
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris 8 mM EDTA 10 mM SDS Ultra Pure add. Aqua dest. pH 6,8
5x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris 17,5 mM SDS Ultra pure 1,92 M Glycin add. Aqua dest. pH 8,9
5x TBS-Tween	0,25 M Tris 2,5 M NaCl add. Aqua dest. pH 7,4
1x TBS-Tween	20% 5 x TBS 1% Tween® 20 add. Aqua dest. pH 7,4
10x Twobin-Tansferpuffer	25 mM Tris 1,92 M Glycin 7 mM SDS Ultra pure add. Aqua dest.
1x Twobin-Transferpuffer	10% 10 x Twobin-Transferpuffer 20% Methanol add. Aqua dest.
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris 8 mM EDTA 10 mM SDS add. Aqua dest. pH 8,8

**Tab. 9: Standardrezepturen für Trenn- bzw. Sammelgele für die SDS-Page für verschiedene Proteingrößen**

	Trenngele			Sammelgel
Konzentration	8% (50-200 kDa)	10% (15-100 kDa)	12% (10-70 kDa)	4% (> 200 kDa)
Empfohlene Proteingrößen	50-200kDa	15-100kDa	10-70kDa	4% (>200kDa)
Aqua dest.	7,30 ml	6,30 ml	5,30 ml	7,80 ml
Trenngel-Puffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	-	-	3,30 ml
30% Acrylamid/Bis	4,00 ml	5,00 ml	6,00 ml	2,00 ml
TEMED	50 µl	50 µl	50 µl	40 µl
10% APS	90 µl	90 µl	90 µl	90 µl

**Tab. 10: Software**

Verwendung	Bezeichnung	Firma	Ort
Digitale Bildverarbeitung	AxioVision 4.8.2	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Berechnung der Mittelwerte	Excel, Microsoft Office 2011	Microsoft Deutschland GmbH	Unterschleißheim, Deutschland
Bestimmung der Proteinkonzentration	MARS Data Analysis Software	BMG LABTECH GmbH	Ortenberg, Deutschland
Erstellung von Abbildungen	Power Point Microsoft Office 2011	Microsoft Deutschland GmbH	Unterschleißheim, Deutschland
Auswertung der Western Blots	Vision Capt BIO-1D analysis software	Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland
Statistische Auswertung	SPSS Software 19	IBM	Armonk, NY, USA

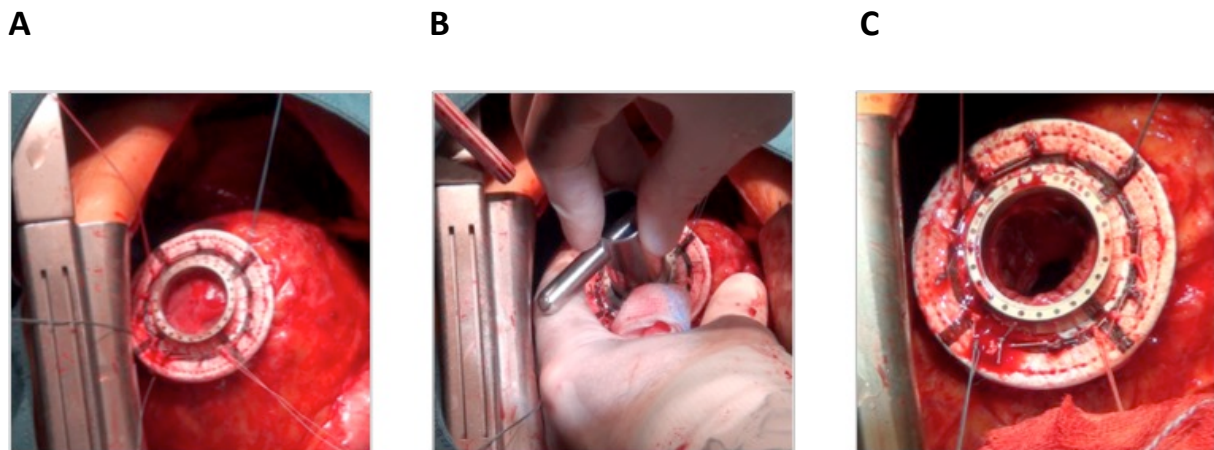
## **4 Methoden**

### **4.1 Probengewinnung**

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig genehmigt (Antrags-Nummer: 240/16-ek). Alle Patienten wurden am Herzzentrum Leipzig im Rahmen der Studie aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Einwilligung. Gewebeproben von 64 Patienten, die im Zeitraum von Oktober 2014 bis März 2015 am Herzzentrum Leipzig operiert wurden, konnten in die Untersuchung eingeschlossen werden. Von diesen 64 Patienten wurde n=24 Patienten mit einer ICM und n=28 Patienten mit einer DCM ein Linksherzunterstützungssystem (LVAD) implantiert. Weitere n=12 Patienten unterzogen sich einer Morrow-Resektion. Die Gewebeproben wurden im Rahmen der chirurgischen Eingriffe entnommen und wie im Folgenden beschrieben aufgearbeitet.

#### **4.1.1 Probengewinnung bei LVAD-Implantation**

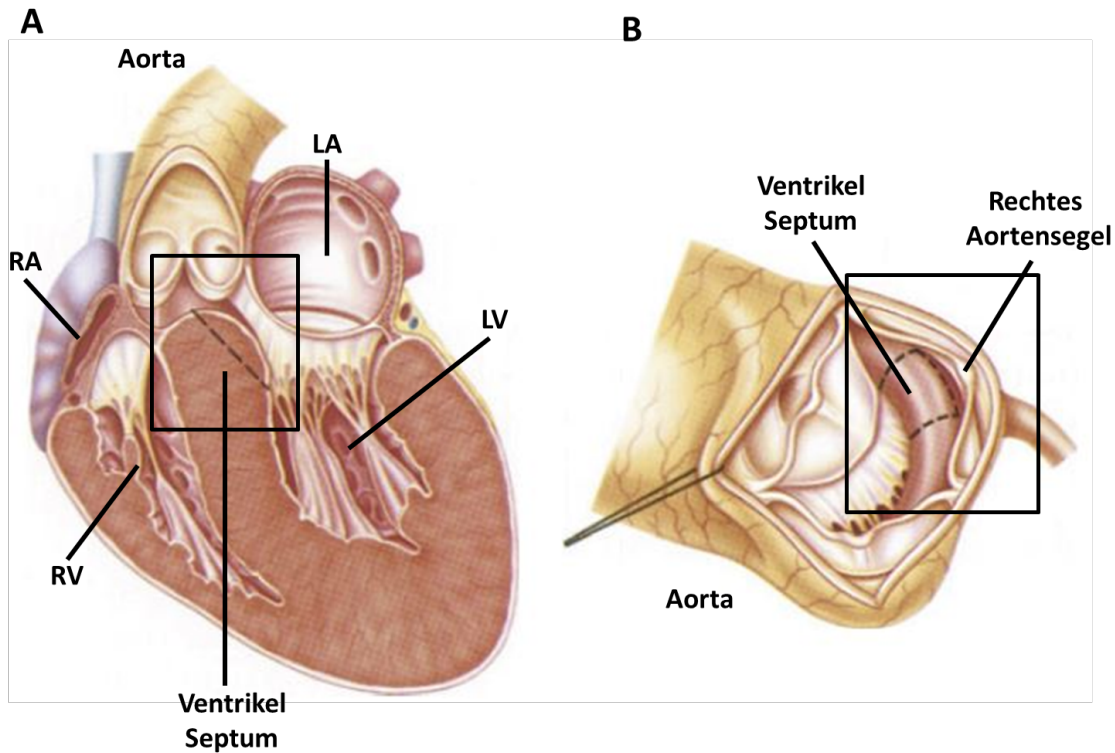
Der Patient wurde zunächst abgewaschen und steril abgedeckt. Anschließend erfolgten eine mediane, longitudinale Sternotomie und das Spalten des Thymusfettgewebes. Nach der Längseröffnung des Perikards wurde der Patient heparinisiert und an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Die Körpertemperatur wurde auf 36°C abgesenkt. Der linke Ventrikel wurde mittels Nadel und Echokontrolle zur Identifikation der Implantationsstelle punktiert. Der Fixierring wurde mit filzgesicherten Einzel- und TEVD-Nähten aufgenäht. Der Ring wurde mit ProGel festgeklebt und der Apex ausgestanzt (Abb. 5). Das ausgestanzte Biopat aus dem Myokard des linken Ventrikels diente als Probe und wurde nach kurzzeitiger Lagerung in steriler NaCl-Lösung und Präparation in flüssigen Stickstoff überführt.



**Abb. 5: Beispielhafte Anlage eines linksventrikulären Herzunterstützungssystems (LVAD).** Dargestellt sind der aufgenähte Fixierring (A), das Austanzen des Bioprotats (B) und ein Ausschnitt des ausgestanzten Ventrikels (C).

#### 4.1.2 Probengewinnung im Rahmen von Morrow-Resektionen

Bei einer Resektion nach Morrow wird ein Teil des hypertrophierten Septums im linksventrikulären Ausflusstrakt entfernt, um den Ausflusstrakt zu vergrößern. Der Patient wurde zunächst abgewaschen und steril abgedeckt. Anschließend erfolgten eine mediane, longitudinale Sternotomie und das Spalten des Thymusfettgewebes. Nach der Längseröffnung des Perikards wurde der Patient heparinisiert und die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Die Körpertemperatur wurde auf 36°C abgesenkt. Nach kardioplegischem Herzstillstand wurde die Aorta quer eröffnet und das rechte Aortensegel hochgeklappt. 5 bis 10 mm unter dem Klappenanulus erfolgte eine quere Inzision, gefolgt von 2 parallelen Längsschnitten in der septalen Muskulatur.<sup>37</sup> Das entnommene Bioprotat wurde nach kurzzeitiger Lagerung in steriler NaCl-Lösung und Präparation in flüssigen Stickstoff überführt.



**Abb. 6: Schematische Darstellung einer Morrow-Resektion.** (A) zeigt eine schematische Darstellung der Herzhöhlen mit rechtem Atrium (RA), rechtem Ventrikel (RV), linkem Atrium (LA) und linkem Ventrikel (LV). In (B) ist der operative Zugangsweg zum hypertrophierten Septum über die Aorta dargestellt. Das Rechteck hebt den zu resezierenden Septumanteil im linksventrikulären Ausflusstrakt hervor (verändert nach <sup>37</sup>).

#### 4.2 Verarbeitung der Proben

Die bei einem LVAD oder einer Morrow-Resektion gewonnenen Proben wurden mit einem sterilen Skalpell und einer Pinzette auf 30-50 mg große Stücke zerkleinert und je nach Probengröße auf 2,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und anschließend bei -80°C gelagert.

Je ein Gewebestück wurde für histologische Untersuchungen in 4%-Formalin-PBS überführt, in dem es für 48-72h fixiert wurde. Die Einbettung der Probe in Paraffin erfolgte danach mithilfe des Einbettautomaten über Nacht nach folgendem Programm: je 60 min in 50%, 70%, 80% EtOH, dreimal 60 min 96% EtOH, 60 min in 100% EtOH, dreimal 30 min in Xylol und zweimal 90 min in Paraffin. Anschließend wurden die Präparate in Paraffinblöckchen ausgebettet. Mit einem Mikrotom wurden



4 µm Gewebeschnitte für die histologischen Färbungen hergestellt, die auf dem Objektträger über Nacht bei 60°C im Wärmeschrank getrocknet und bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert wurden.

#### **4.3 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration**

Für die Proteinextraktion wurden 30-50 mg der kryokonservierten mit 500 µl eisgekühltem RIPA-Lysepuffer oder mit 500 µl eisgekühltem Relaxing-Lysepuffer versetzt und mit einem Homogenisierstab zerkleinert. Nach der Überführung der Gewebelysate in 1,5 ml-Reaktionsgefäße auf Eis erfolgten zum Zellaufschluss zwei Behandlungszyklen im Ultraschallwasserbad für jeweils 5 min. Um die Zelltrümmer von den Proteinen zu trennen, wurden die in Ripa-Puffer lysierten Zellen bei 4°C für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Bei der Vorgehensweise im Relaxing-Puffer entfiel ein Zentrifugationsschritt. Die Überstände wurden abgenommen, aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test). Die in der BCA enthaltenen zweiwertigen Kupfer-Ionen werden durch die Interaktionen mit Peptidbindungen zu einwertigen Ionen reduziert, wodurch sich die  $\text{Cu}^{1+}$ -Bicinchoninsäure-Komplexe violett verfärben. Aufgrund der Violettfärbung verschiebt sich das Extinktionsmaximum zu 562 nm. Zunächst wurde eine Standardreihe mit Rinderserumalbumin (Tab. 11) hergestellt, welche als Referenz für die gemessenen Absorptionswerte der Proben diente.

**Tab. 11: Verdünnungsreihe des Rinderserumalbumins für die Proteinkonzentrationsbestimmung**

Standard	Konzentration in µg/µl	Verdünnung	RIPA-Puffer/Relaxing- Puffer in µl
<b>A</b>	2,000	300 µl aus BSA-Stock	0
<b>B</b>	1,500	375 µl aus BSA-Stock	125
<b>C</b>	1,000	325 µl aus BSA-Stock	325
<b>D</b>	0,750	175 µl aus B	175
<b>E</b>	0,500	325 µl aus C	325
<b>F</b>	0,250	325 µl aus E	325
<b>G</b>	0,125	325 µl aus F	325
<b>H</b>	0,025	100 µl aus G	400

Die hergestellten und bei -80°C kryokonservierten Gewebelysate wurden 1:10 mit dem jeweiligen Lysepuffer (RIPA- bzw. Relaxing-Puffer) verdünnt. Das Mischungsverhältnis von BCA und Kupfersulfat betrug 1:50. Anschließend wurden jeweils 10 µl der Standard-Lösung A-H in Doppelbestimmung und je 10 µl der zu untersuchenden Proben in Dreifachbestimmung auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Zu jeder Probe wurden 200 µl BCA-Reagenz versetzt. Die Proben und das BCA-Reagenz wurden durch Schütteln gut vermischt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Messung der Absorption fand mit einem FLUOstar OPTIMA bei 560 nm statt. Mit Hilfe der Absorptionswerte der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt, und mittels linearer Regression die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

#### **4.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde eine Sodium-dodecyl-sulfat (SDS) – Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. SDS ist ein anionisches Tensid, das durch seine stark negative Ladung die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine aufschließt. Auf diese Weise werden die gefalteten Proteine linearisiert, sodass in einem diskontinuierlichen Gel eine Auftrennung

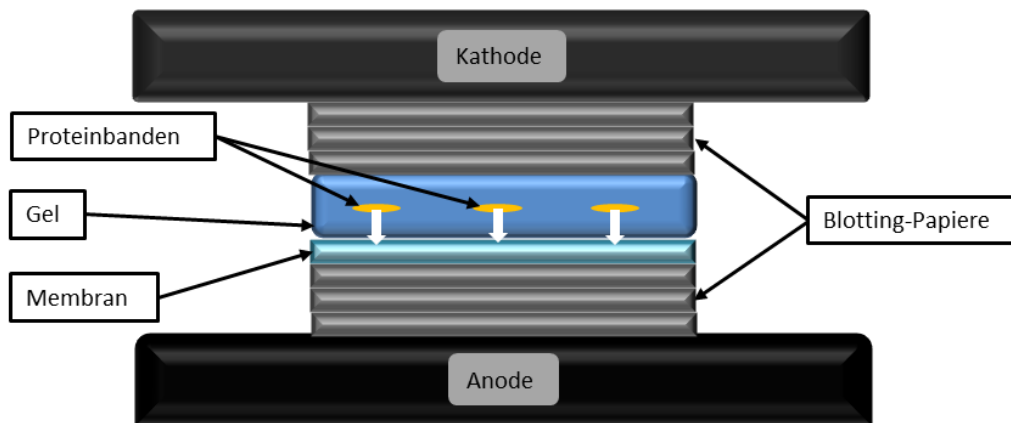
entsprechend der Aminosäurekettenlänge erfolgen kann. Die Proteine erhalten durch das SDS eine negative Ladung, weshalb sie in Richtung der Anode wandern, wobei kleinere Proteine im Gel weiter wandern als größere Proteine. Die vorhandenen Disulfidbrücken der Proteine werden durch zugegebenes  $\beta$ -Mercaptoethanol gespalten.

Zunächst wurden die Glasplatten mit Isopropanol gesäubert und in einer Haltevorrichtung befestigt. Zuerst wurde ein 12%iges Trenngel (Tab. 9) zwischen den Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und mit destilliertem Wasser gespült. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel (Tab. 9) gegossen und die Probenkämme eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurden die Glasplatten mit den Gelen in der Elektrophorese-Apparatur befestigt. Die Kammern wurden mit 1× SDS-Laufpuffer gefüllt und die Kämme anschließend entfernt. Die Proteinproben wurden zuvor mit 5× Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 95°C aufgekocht und nacheinander mit einer Mikroliterspritze in die Geltaschen gefüllt. Um eine Identifikation der Banden zu ermöglichen, wurde zudem ein Proteinmarker mit einem Spektrum von 10 bis 70 kDa für das Molekulargewicht aufgetragen. Die Elektrophorese-Kammer wurde an ein Stromversorgungsgerät angeschlossen und eine konstante Spannung von 70 mV angelegt. Wenn die Proben das Sammelgel durchlaufen und sich an dem Übergang zum Trenngel gesammelt hatten, wurde die Spannung auf 90 mV erhöht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über 90 min.

#### 4.5 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines elektrophoretischen Transfers in einer Blot-Apparatur mittels *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Hierfür wurden je Acrylamid-Gel 6 *Blotting*-Papiere in 1× Transfer-Puffer getränkt. Eine PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert, um die hydrophobe Membran für die wässrigen Lösungen zugänglich zu machen. Nach dem vorsichtigen Entfernen der Glasplatten der Elektrophoreseapparatur wurde das Sammelgel durch einen Spatel abgetrennt. Als nächster Schritt

erfolgte die Vorbereitung der Blot-Apparatur. Auf die Anode wurde ein Stapel aus drei *Blotting*-Papieren geschichtet, worauf die Membran und das Gel luftblasenfrei abgelegt und darauf ein weiterer Stapel von drei *Blotting*-Papieren geschichtet wurden. Mit der Kathode wurde der Aufbau abgeschlossen (Abb. 7). Das Blotten der Proben erfolgte mit 400 mA für 90 min.



**Abb. 7: Schematischer Aufbau der Blot-Apparatur.** Die weißen Pfeile zeigen die Laufrichtung der Proteine an.

Um den Transfer der Proteine optisch überprüfen zu können, wurde die PVDF-Membran nach dem Blot mit 0,1% Ponceaurot-Lösung angefärbt und danach mehrmals mit Wasser entfärbt. Die Membran wurde anschließend für 2 h mit 5% Magermilch-Lösung bei Nachweis von Ubiquitin, MAFbx, eIF4E und GAPDH bzw. Roti-Block-Lösung bei Nachweis von MuRF-1, K48 und K63 blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Primärantikörper (Tab. 6) wurde in der entsprechenden Verdünnung in 5% Magermilch-Lösung bzw. Roti-Block-Lösung angesetzt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag erfolgten drei Waschschrte in einer *Tris-buffered Saline with Tween20*-Lösung (TBST-Lösung) für je 10 min. Die Sekundärantikörper (Tab. 6) wurde ebenfalls in 5% Magermilch-Lösung bzw. Roti-Block-Lösung angesetzt und 60 min unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran mit TBST-Lösung gewaschen und mit 2 ml *Enhanced chemiluminescence*-Lösung (ECL-Lösung) im Dunkeln für

5 min inkubiert. Die Analyse der Blots wurde mit dem Fusion Solo S System durchgeführt. Anschließend wurde die PVDF-Membran erneut drei Mal für 5 min in TBST gewaschen. Als interne Ladekontrolle wurde neben den zu untersuchenden Antigenen, die das Protein Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen. Zum Schluss erfolgte die Auswertung über das Programm VisionCapt. Dieses Programm erfasst die detektierte Fluoreszenz als Pixelintensität innerhalb eines definierten Grenzwerts. Die Pixelintensität wird in ein Volumen umgerechnet, das Aufschluss über den Proteingehalt der ausgewerteten Banden gibt.

#### **4.6 Immunhistologische Färbungen**

Die immunhistologischen Analysen für die Ubiquitinablagerungen, für den Apoptose-induzierenden-Faktor (AIF) sowie die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung erfolgten an humanen Paraffinschnitten.

##### **4.6.1 Ubiquitin-Färbung**

Die Schnitte wurden für die Ubiquitin-Färbung zunächst 3 Mal für je 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend je 10 min in 100% -, 95% -, 70% - und 50% Ethanol rehydriert. Nach einer 5 minütigen Inkubation in destilliertem Wasser, wurden sie 10 min in 1x *Tris-buffered saline* (TBS) gewaschen. Für die Permeabilisierung wurde die Lösung für 30 min in 0,01 M Natriumacetat bei 700 Watt in einem Mikrowellenofen gekocht. Nachdem die Schnitte 30 min abgekühlt waren, wurde sie erneut 10 min in 1x TBS gewaschen, anschließend mit einem Fettstift umrandet und in eine Feuchtkammer überführt. Das Blocken der endogenen Peroxidase erfolgte für 20 min in 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TBS. Anschließend wurde 60 min in 2% Bovinem Serumalbumin (BSA)/TBS bei Raumtemperatur blockiert und mit dem Primärantikörper (Tab. 6) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach dem Erwärmen bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tab. 7) für 60 min. Anschließend wurden die Schnitte 2x 5 min in 1x TBS gewaschen. Das Färben erfolgte für 30 min mit einer 3-Amino-9-ethylcarbazol-Färbelösung (AEC). Nach einem 5-minütigen

Waschschritt in destilliertem Wasser erfolgte die Kernfärbung für 5 min in Hämalan und das Bläuen für 10 min in Leitungswasser. Folgend wurde erneut 5 min in destilliertem Wasser gewaschen, der Fettstift entfernt und mit Glycerolgelatine eingedeckelt.

#### **4.6.2 Färbung des Apoptose-induzierenden Faktors AIF**

Für die Färbung des apoptose-induzierenden Faktors AIF wurden die Schnitte ebenfalls zunächst 3 Mal für je 10 min in Xylol entparaffiniert, je 5 min in 100% -, 95% - und 70% Ethanol gewaschen und 5 min in destilliertem Wasser rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in 1x TBS gewaschen und 30 min in 0,01 M Natriumcitrat bei 700 Watt in einem Mikrowellenofen permeabilisiert. Das Blocken der endogenen Peroxidase erfolgte für 50 min in 60% Methanol, 40% TBS und 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nach drei weiteren Waschschritten für je 5 min in 1x TBS wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und in eine Feuchtkammer überführt. In dieser erfolgte ein weiterer Blockierungsschritt für 60 min in 2% BSA in 1x TBS. Die Schnitte wurde über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (Tab. 7) inkubiert. Am folgenden Färbetag wurden die Schnitte zunächst für 30 min erwärmt und anschließend 3x 5 min in 1x TBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das Dako Envision Detection System, welches den Sekundärantikörper enthielt, auf den Schnitt aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Folgend wurde erneut 3x 5 min in 1x TBS gewaschen und für 10 min in der AEC-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde 5 min in 1x TBS gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte für 5 min in Hämalan und das Bläuen für 5 min in Leitungswasser. Schließlich wurde der Fettstift entfernt und die Schnitte mit Glycerolgelatine eingedeckelt.

#### **4.6.3 Hämatoxylin/Eosin-Färbung**

Die Schnitte für die HE-Färbung wurden zuerst 10 min und anschließend 3 min in Xylol entparaffiniert. Danach wurden sie für je 3 min in 100% -, 95% -, 70% -, 50% Ethanol und 2 min in destilliertem Wasser rehydriert. Die Kernfärbung erfolgte für 10 min in Hämalan und das Bläuen für

15 min in Leitungswasser. Nachdem sie für 1 min in 0,1% HCl gespült wurde, erfolgte die Färbung des Zytoplasmas mit Eosin G 0,25% für 5 min. Erneut wurden die Schnitte 1 min in destilliertem Wasser gewaschen und für je 3 min eine aufsteigende Ethanolreihe von 70%, 95% und 100% durchlaufen. Nach weiteren 3 min in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckelt.

#### 4.7 Proteasomaktivitätsmessung

Das Proteasom hat drei katalytische Zentren, deren Aktivität durch die Zugabe von Succinyl-Leucin-Valin-Tyrosin-Methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC), Benzyloxycarbonyl-Valin-Glycin-Arginin-Methylcoumarin (BZ-VGR-AMC) und Benzyloxycarbonyl-Leucin-Leucin-Glutaminsäure-Methylcoumarin (Z-LLE-AMC) quantifiziert wurden. Um die Chymotrypsin-ähnliche-Aktivität zu untersuchen wurde das Substrat Suc-LLVY-AMC hinzugeben. Die Aktivität des Trypsin-ähnliche-Zentrums wurde mit dem Substrat BZ-VGR-AMC und die Caspase-ähnliche-Aktivität mit dem Substrat Z-LLE-AMC nachgewiesen. Die Aminosäuren der zugegebenen Substrate wurden während des Assays proteolytisch abgebaut, wobei das 7-Amino-4-methylcoumarin-Peptid (AMC) abgespalten wird und die Fluoreszenz hervorruft.

Die hergestellten und bei -80°C tiefgefrorenen Gewebelysate wurden in 500 µl Relaxing-Puffer aufgeschossen. Anschließend wurden 20 µg der Proben im Proteasom-Aktivitäts-Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,9 ml kaltem Wasser gestoppt, das spezifische Substrat wurde hinzugegeben und für 10 min auf Eis gelagert. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung mit und ohne den Proteasom-Inhibitor MG-132. Das spezifische Substrat in der Probe aktiviert die entsprechende proteasomale Aktivität. Der Proteasom-Inhibitor MG-132 hemmt die Aktivität der drei Zentren, sodass die Aktivität, die ohne MG-132 gemessen wurde, der Aktivität des proteasomalen Zentrums entspricht, dessen spezifisches Substrat hinzugegeben wurde. Die Messung erfolgte über 10 min mit einer Exzitation von 380 nm. Die Emission wurde bei 440 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Anschließend wurde die gemessene Fluoreszenz in einem Diagramm über 10 min aufgetragen. Daraus ergibt sich eine Standardkurve, deren Steigung den

Substratumsatz pro Zeit widerspiegelt. Die Differenz der Steigung der Standardkurve mit und ohne Proteasominhibitor wurde auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe genormt und wird als Aktivität des jeweiligen proteasomalen Zentrums interpretiert.

#### 4.8 NADPH-Oxidase-Aktivitätsmessung

Die Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) ist ein Enzym, welches in der mitochondrialen Zellmembran lokalisiert ist. Die NADPH-Oxidase katalysiert die Reduktion von NADPH zu  $\text{NADP}^+$  und  $\text{H}^+$  unter Sauerstoffradikalbildung. Somit ergibt sich folgende Reaktionsgleichung  $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+$ . Die Bildung von Sauerstoffradikalen, sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), führt zur Oxidierung von DNA, Proteinen und Lipiden. Dies wiederum kann zelluläre Stressantworten auslösen, die zur Apoptose führen. Während die Messung von ROS sehr komplex ist und umfangreiche Erfahrung voraussetzt, kann die Enzymaktivität der NADPH-Oxidase Aktivität mit geringerem Aufwand gemessen werden. Eine gesteigerte NADPH-Oxidase-Aktivität lässt darauf schließen, dass die Menge an ROS innerhalb der Zelle gesteigert ist. Der in dieser Arbeit verwendete Assay zur Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität basiert darauf, dass die Reduktion von Cytochrom c ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ) durch ROS photospektrometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 550 nm quantifiziert werden kann.

Hierfür wurde zunächst die Krebs-Henseleit-Lösung frisch hergestellt (Tab. 8) und 5 min mit  $\text{O}_2$  begast. Für die Messung wurde 1 ml Krebs-Henseleit-Lösung, 20  $\mu\text{l}$  Cytochrom c und 10  $\mu\text{l}$  NADPH vermischt und in eine 1ml-Küvette pipettiert. Nach 3 min Messung bei 550 nm im Photospektrometer wurden je 2,5  $\mu\text{l}$  der in RIPA-Puffer hergestellten Probe hinzugegeben und weitere 7 min gemessen. Mit dem Programm Lambda 20 wurde im Anschluss an jede Messung die Steigung der Geraden, die der Aktivität der NADPH-Oxidase entspricht, vor (Pre-Slope 0-3 min) und nach Zugabe der Probe (Post-Slope 4-9 min) nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\frac{\text{pre slope} - \text{post slope}}{19 \times 400}}{\text{Proteinkonzentration}} = \text{Aktivität}$$



Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen.

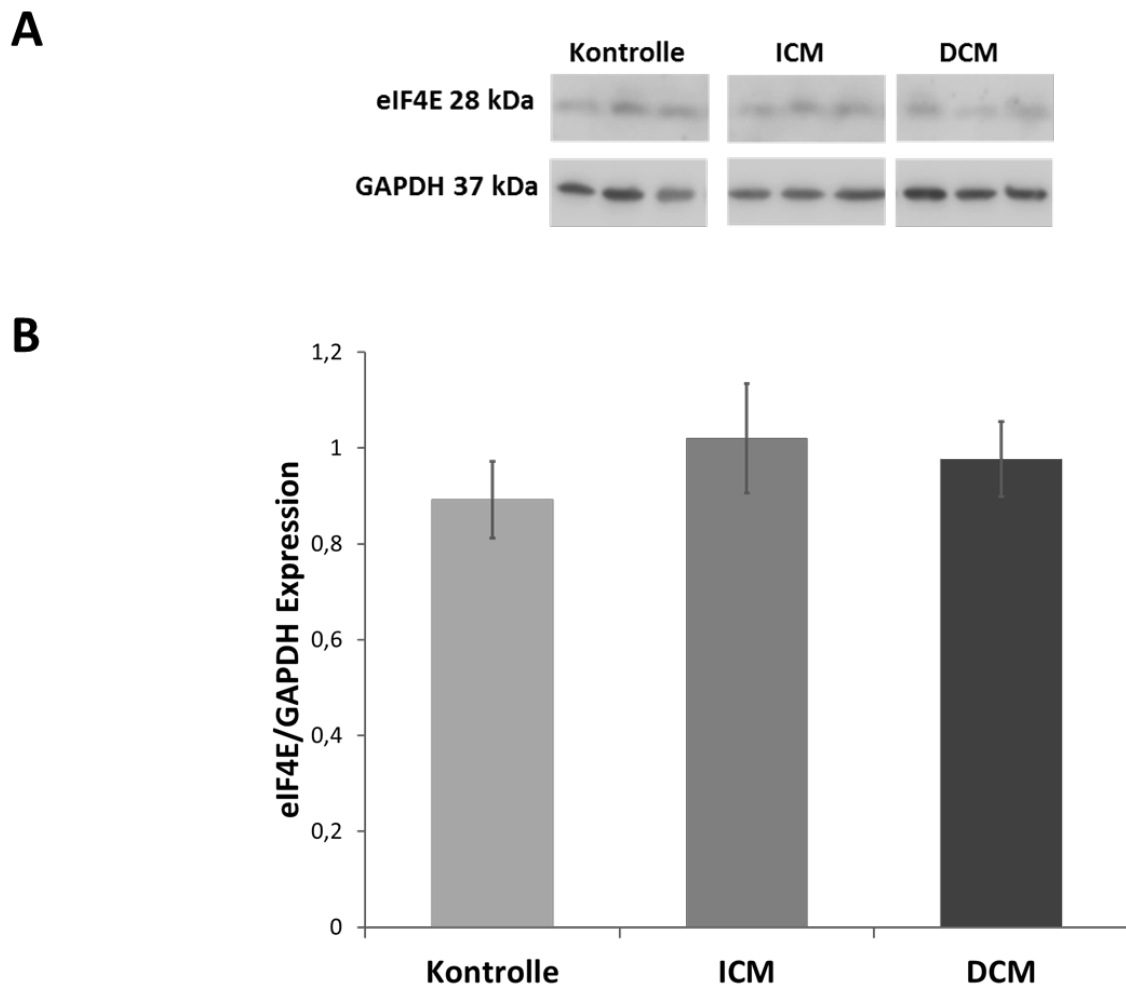
#### **4.9 Statistik**

Alle Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) angegeben, sofern nicht anders vermerkt. Für den Vergleich der drei Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Dafür wurde zunächst der sogenannte Levene-Test zur Prüfung der Varianzhomogenität durchgeführt. Bestätigte der Levene-Test die Varianzhomogenität, wurde der Globaltest der ANOVA berechnet. Bei signifikantem Globaltest wurde die post-hoc Analyse nach Scheffé ausgewertet, um zu identifizieren, zwischen welchen Gruppen die Unterschiede bestehen. Bei signifikantem Levene-Test (Varianzheterogenität) wurde der Welch-Test zur Feststellung von Gruppenunterschieden verwendet. Bei signifikantem Welch-Test wurde die post-hoc Analyse nach Dunnett-T3 ausgewertet. Sofern nicht anders angegeben, sind im Text die p-Werte der Globalteste und in den Grafiken die p-Werte der post-hoc Analysen angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit der SPSS-Software 19. Für  $p < 0,05$  wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Translation von Proteinen

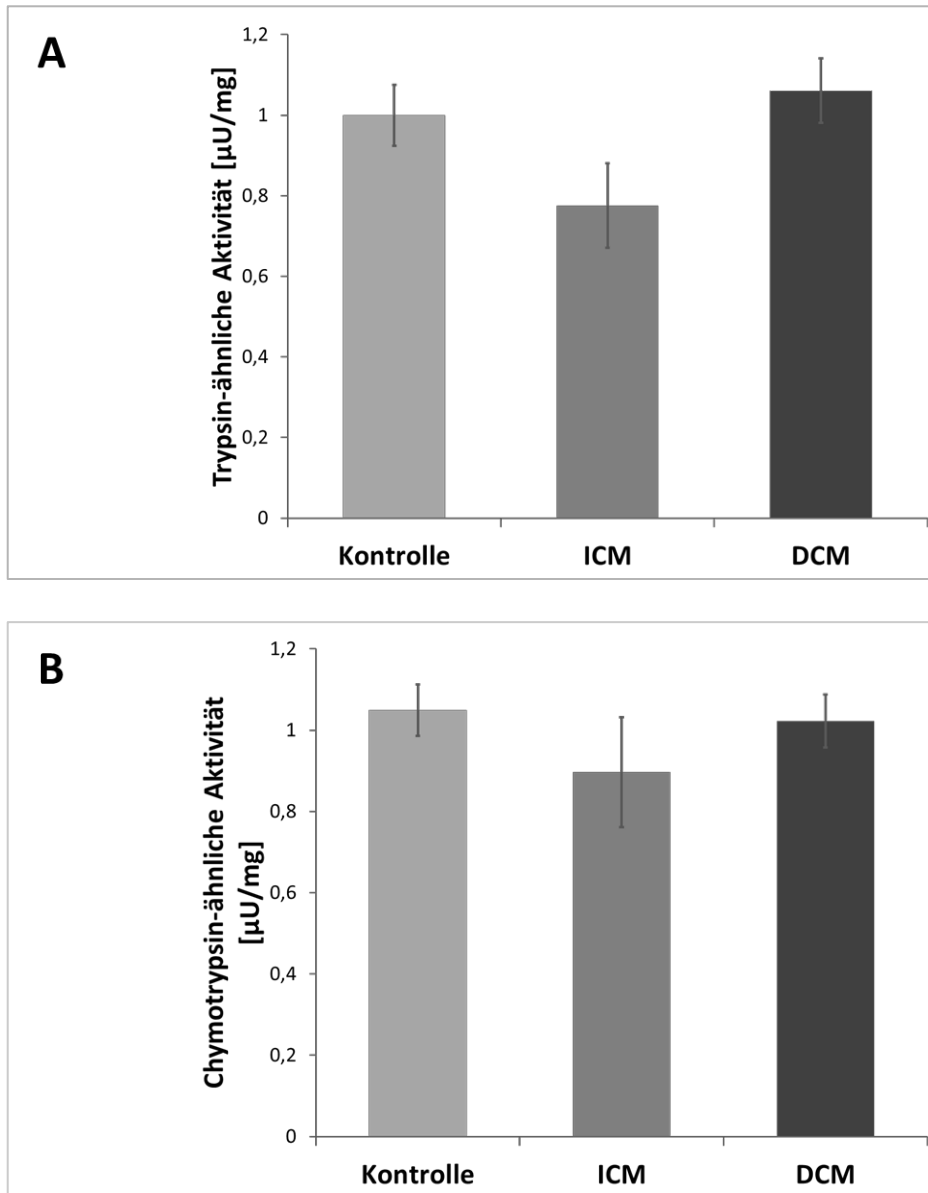
Die Expression des Translationsfaktors eIF4E war zwischen der Kontrolle ( $0,89 \pm 0,08$ ), ICM ( $1,02 \pm 0,11$ ) und DCM ( $0,97 \pm 0,05$ ) vergleichbar ( $p=0,67$ ) (Abb. 8).



**Abb. 8:** Western-Blot-Analyse des Translationsfaktors eIF4E in humanem Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe. Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot (A) für den Translationsfaktor eIF4E und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) sowie die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der Expressionsanalysen von eIF4E im Verhältnis zu GAPDH (B).

## 5.2 Proteasomaktivität

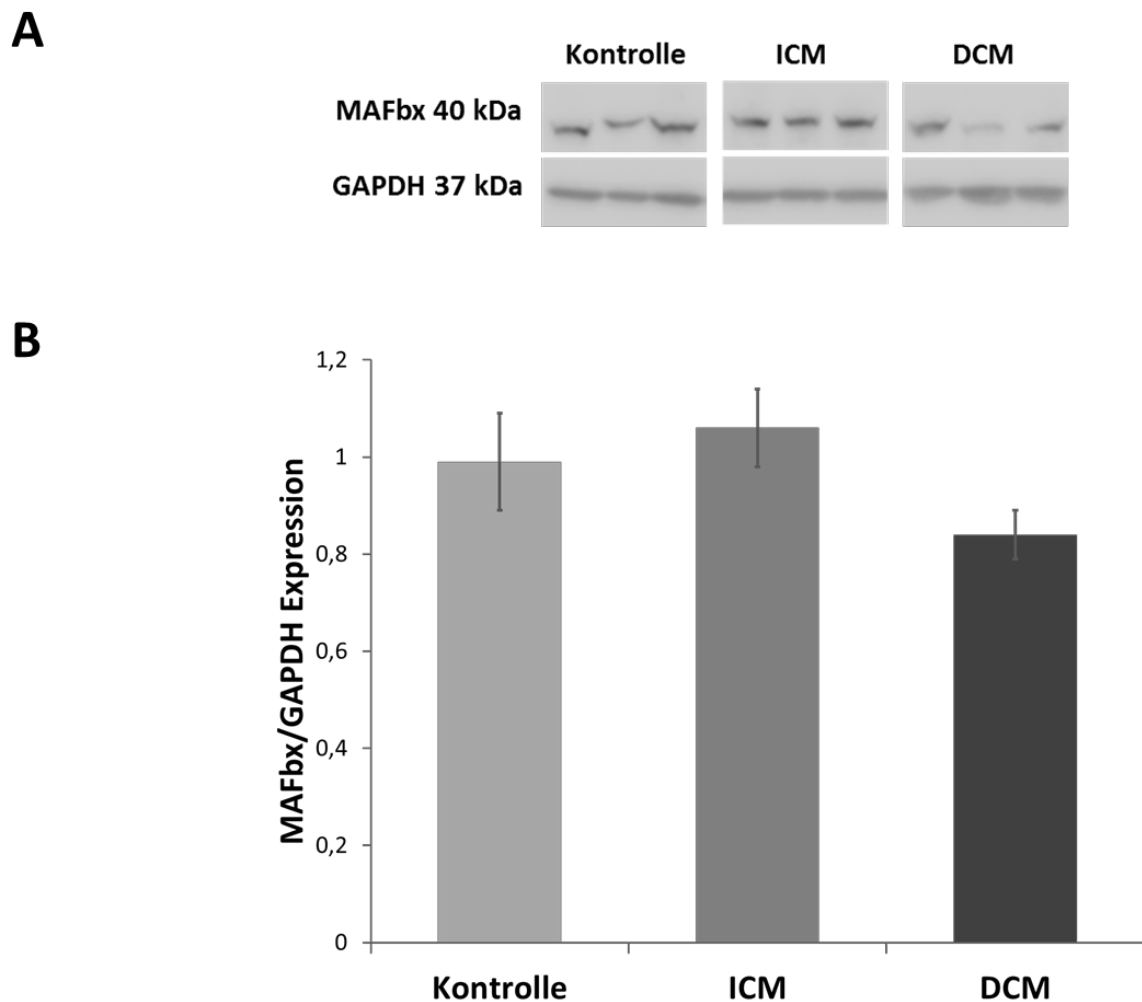
Die proteasomale Aktivität wurde durch die Quantifizierung der einzelnen katalytischen Zentren des Proteasoms untersucht (Abb. 9). Für die Trypsin-ähnliche Aktivität konnte ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (Kontrolle<sub>Trypsin-ähnliche</sub>  $1,00 \pm 0,08 \mu\text{U}/\text{mg}$ ), ICM (ICM<sub>Trypsin-ähnliche</sub>  $0,78 \pm 0,11 \mu\text{U}/\text{mg}$ ) und DCM-geschädigtem Gewebe (DCM<sub>Trypsin-ähnliche</sub>  $1,06 \pm 0,08 \mu\text{U}/\text{mg}$ ) als Trend festgestellt werden ( $p=0,06$ ). Myokardgewebe von Patienten mit ICM wies im Vergleich zu DCM-geschädigtem Gewebe eine geringere Trypsin-ähnliche Aktivität auf ( $p_{\text{ICM vs. DCM}}=0,07$ ). Die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität zeigte in ICM- ( $0,90 \pm 0,14 \mu\text{U}/\text{mg}$ ) und DCM-geschädigtem Gewebe ( $1,02 \pm 0,07 \mu\text{U}/\text{mg}$ ) und der Kontrollgruppe ( $1,05 \pm 0,06 \mu\text{U}/\text{mg}$ ) keine Unterscheide ( $p=0,61$ ).



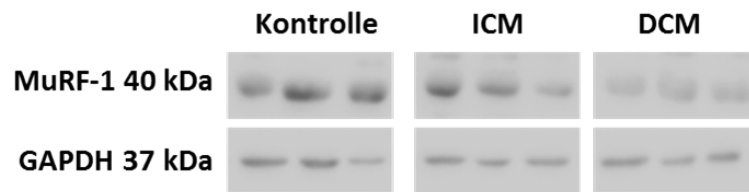
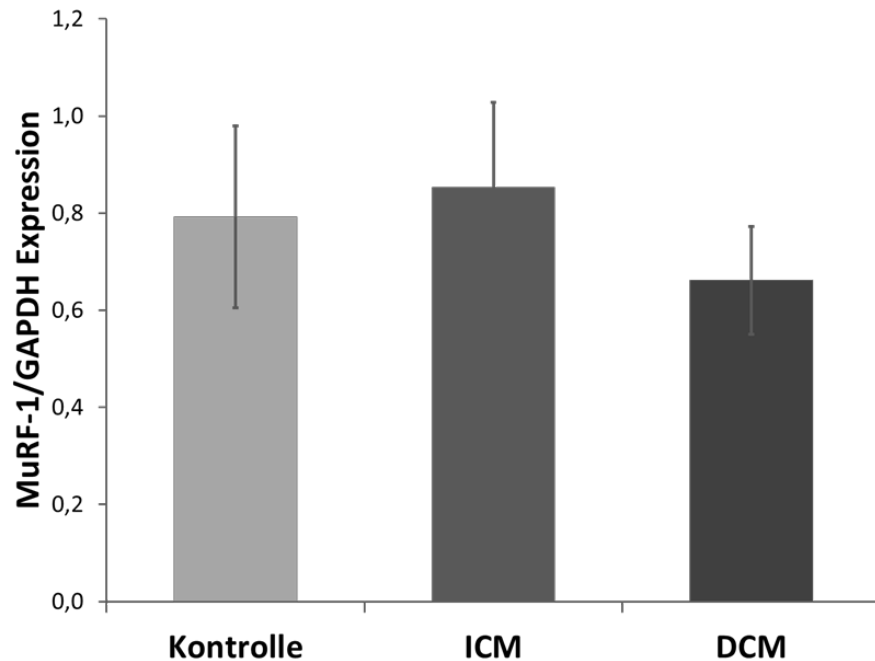
**Abb. 9:** Bestimmung der proteasomalen Aktivität in humanem Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe. Bestimmt wurde (A) die Trypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms sowie (B) die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität.

### 5.3 Expression der E3-Ligasen

Die Quantifizierung der Expression der E3-Ligasen MAFbx und MuRF-1 zeigte, dass DCM-geschädigtes Myokard im Vergleich zu ICM-geschädigtem Gewebe einen statistischen Trend für eine geringere Expressionsrate von MAFbx (DCM:  $0,84 \pm 0,05$ ; ICM:  $1,06 \pm 0,08$ ;  $p_{\text{ICM vs. DCM}}=0,082$ ) aufweist (Abb. 10). Die MuRF-1 Expression (Abb. 11) zeigte keine Unterschiede in der ICM- ( $0,85 \pm 0,17$ ), DCM- ( $0,66 \pm 0,11$ ) oder Kontrollgruppe ( $0,79 \pm 0,19$ ).



**Abb. 10: Western-Blot-Analyse der E3-Ligase *Muscle atrophy F-box* (MAFbx) in humanem Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe.** Dargestellt sind exemplarische Western Blots für MAFbx und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) (A) sowie die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der Expressionsanalysen von MAFbx im Verhältnis zu GAPDH (B).

**A****B**

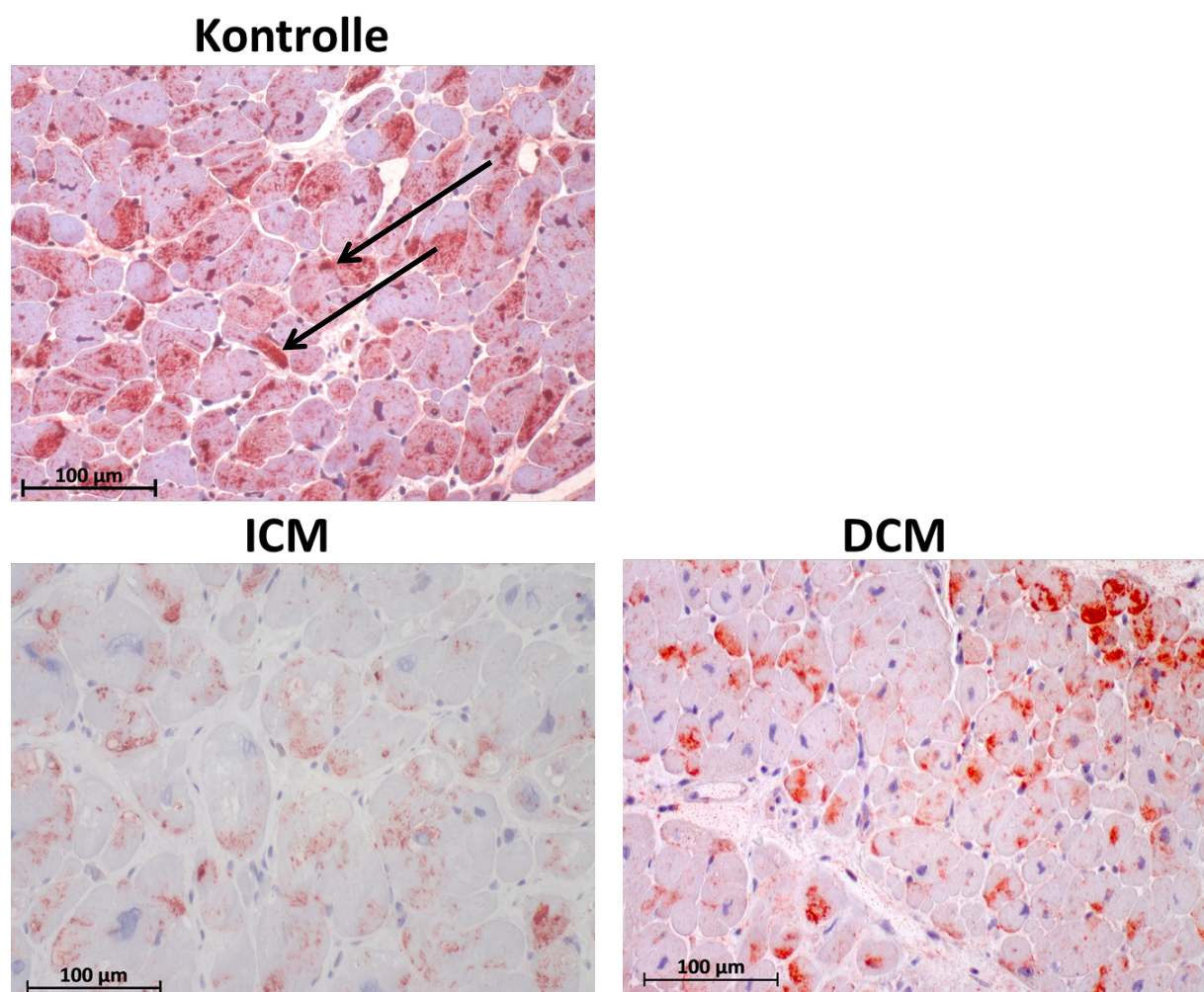
**Abb. 11:** Western-Blot-Analyse der E3-Ligase *Muscle RING-finger protein-1* (MuRF-1) in humanem Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe. Dargestellt sind exemplarische Western Blots für MuRF-1 und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) (A) sowie die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der Expressionsanalysen von MuRF-1 im Verhältnis zu GAPDH (B).

#### 5.4 Ubiquitinierung

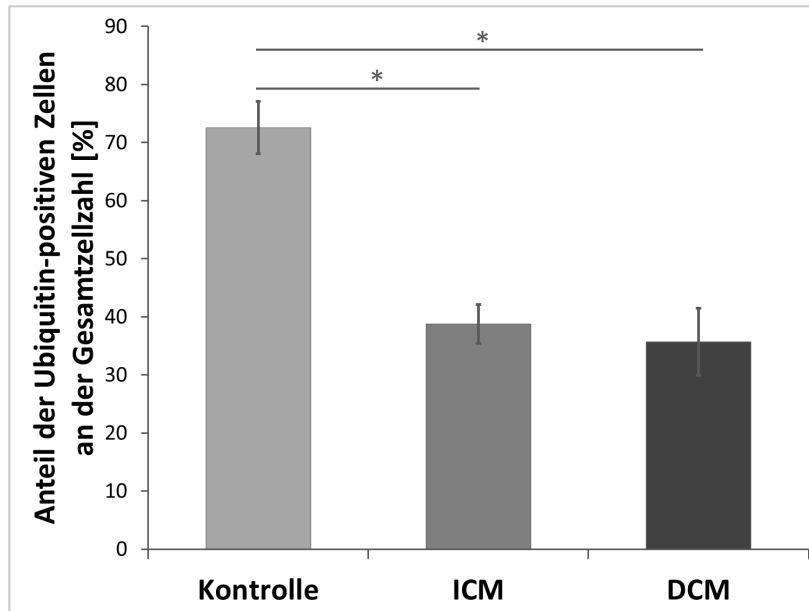
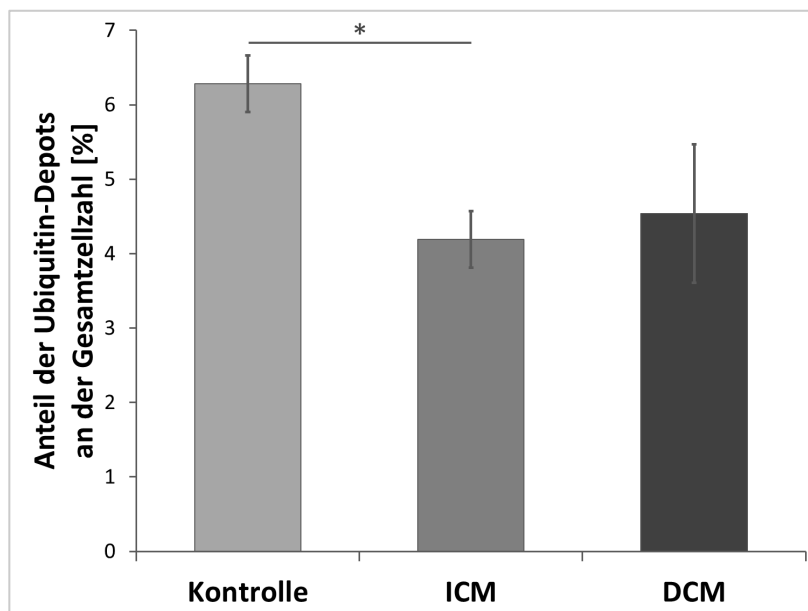
Der Anteil Ubiquitin-positiver Zellen ist sowohl bei ICM- als auch bei DCM-geschädigtem Gewebe signifikant verringert (ICM: 38,81%  $\pm$  3,35%; DCM: 35,69%  $\pm$  5,76%; Kontrolle: 72,56%  $\pm$  4,35%;  $p < 0,05$ ) (Abb. 12 und 13). Die histologische Begutachtung der humanen Myokardschnitte zeigte, dass in den untersuchten Gruppen eine partielle Auflösung der Zellstruktur mit Verlust der Zellkerne auftrat. Es konnte dabei nicht sicher unterschieden werden, ob es zu einem tatsächlichen Verlust der Zellkerne oder zu einem Verlust der Kernfärbbarkeit kam, die in pathologisch verändertem Myokard

auftreten kann. Außerdem waren einige Schnitte in ICM- und DCM-Schnitten von Fibrose-Strukturen durchzogen, weshalb sehr viele kleinere Zellkerne sichtbar waren, die keiner Myozyten-Zelle zugeordnet werden konnten.

Das Auftreten von intrazellulären Anreicherungen von Ubiquitin in sogenannten Ubiquitin-Depots war bei ICM-geschädigtem Myokard im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (ICM:  $4,19\% \pm 0,60\%$ ; Kontrolle:  $6,28\% \pm 0,40\%$ ; DCM:  $4,54\% \pm 0,93\%$ ;  $p_{\text{ICM vs. Kontrolle}}=0,03$ ).



**Abb. 12: Histologische Analyse der Ubiquitin-Expression in humanem Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe.** 3  $\mu\text{m}$ -Schnitte des humanen Myokards wurden nach Ubiquitin-Färbung in 200facher Vergrößerung analysiert. Die Pfeile zeigen beispielhaft Ubiquitin-Depots, welche sich durch eine intensive Rotfärbung als intrazelluläre, Ubiquitin-positive Granula darstellen.

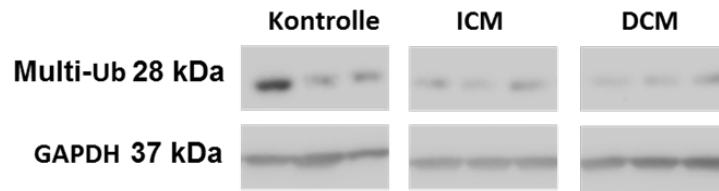
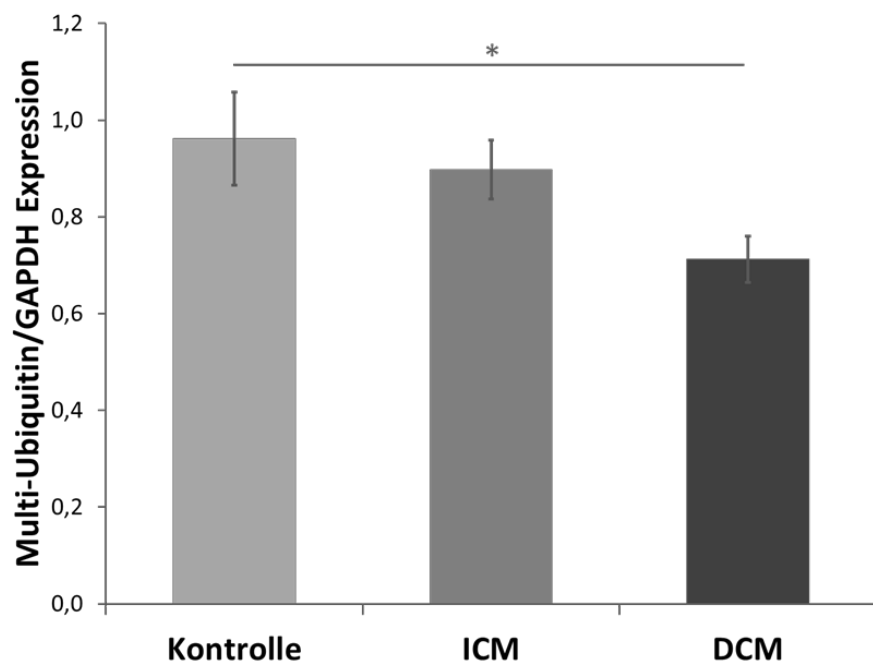
**A****B**

**Abb. 13: Histologische Analyse der Ubiquitin-Expression in humanem Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe.** Es wurde der Anteil der Ubiquitin-positiven Zellen (A) und in weiteren Analysen der Anteil der Zellen mit Ubiquitin-Depots dokumentiert (B). Sterne \* markieren signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) zwischen den Gruppen.

Die Multi-Ubiquitinierung wurde mithilfe von Western-Blot-Analysen untersucht und zeigte signifikante Unterschiede ( $p_{\text{DCM vs. Kontrolle}} = 0,04$ ) zwischen der Kontrollgruppe ( $0,96 \pm 0,07$ ) und DCM-

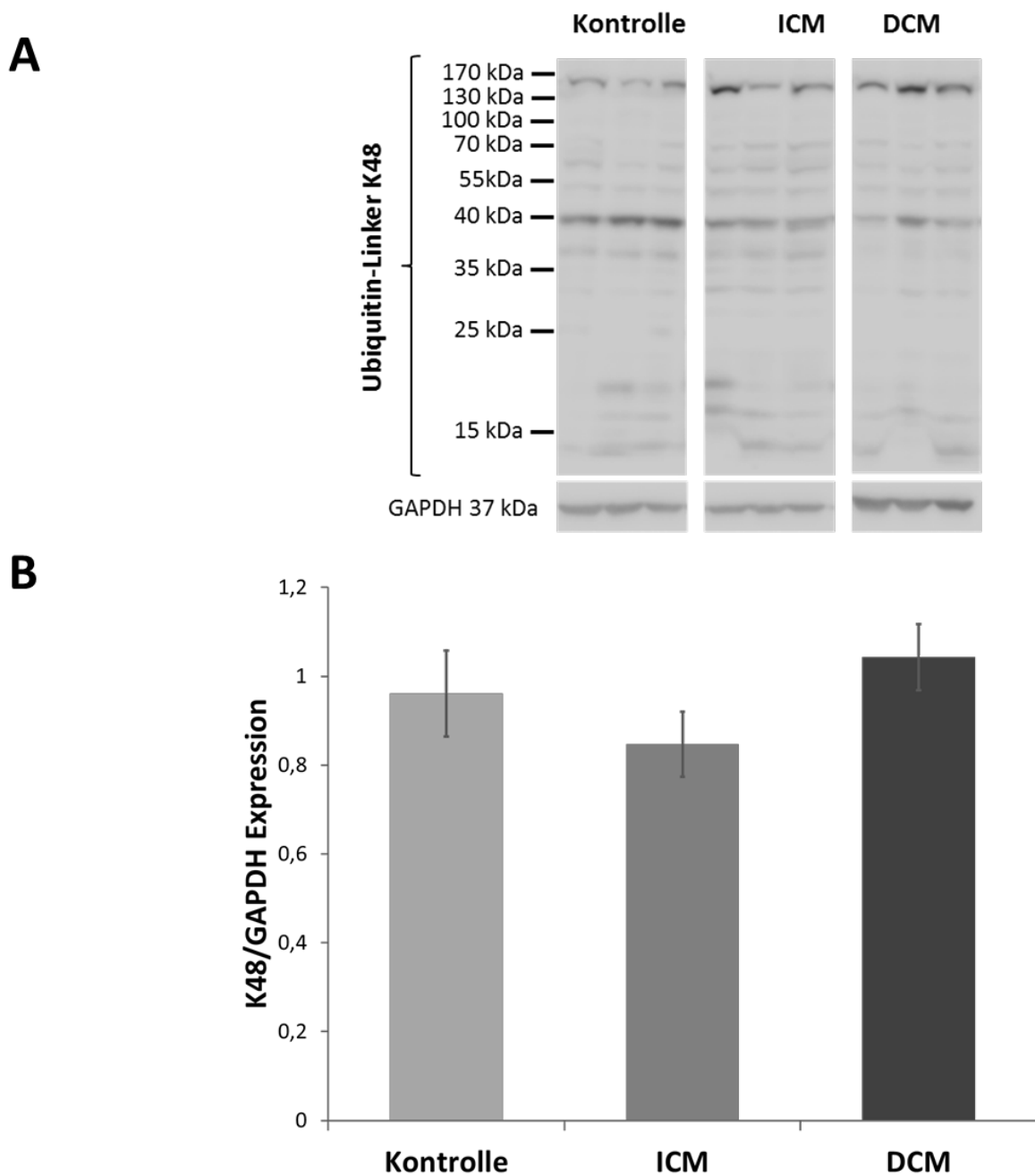


geschädigtem Myokard ( $0,71 \pm 0,05$ ). Der Anteil von Multi-Ubiquitin in ICM-Gewebe ( $0,90 \pm 0,06$ ) veränderte sich im Vergleich zur Kontrolle nicht ( $p_{\text{ICM vs. Kontrolle}}=0,81$ ) (Abb. 14).

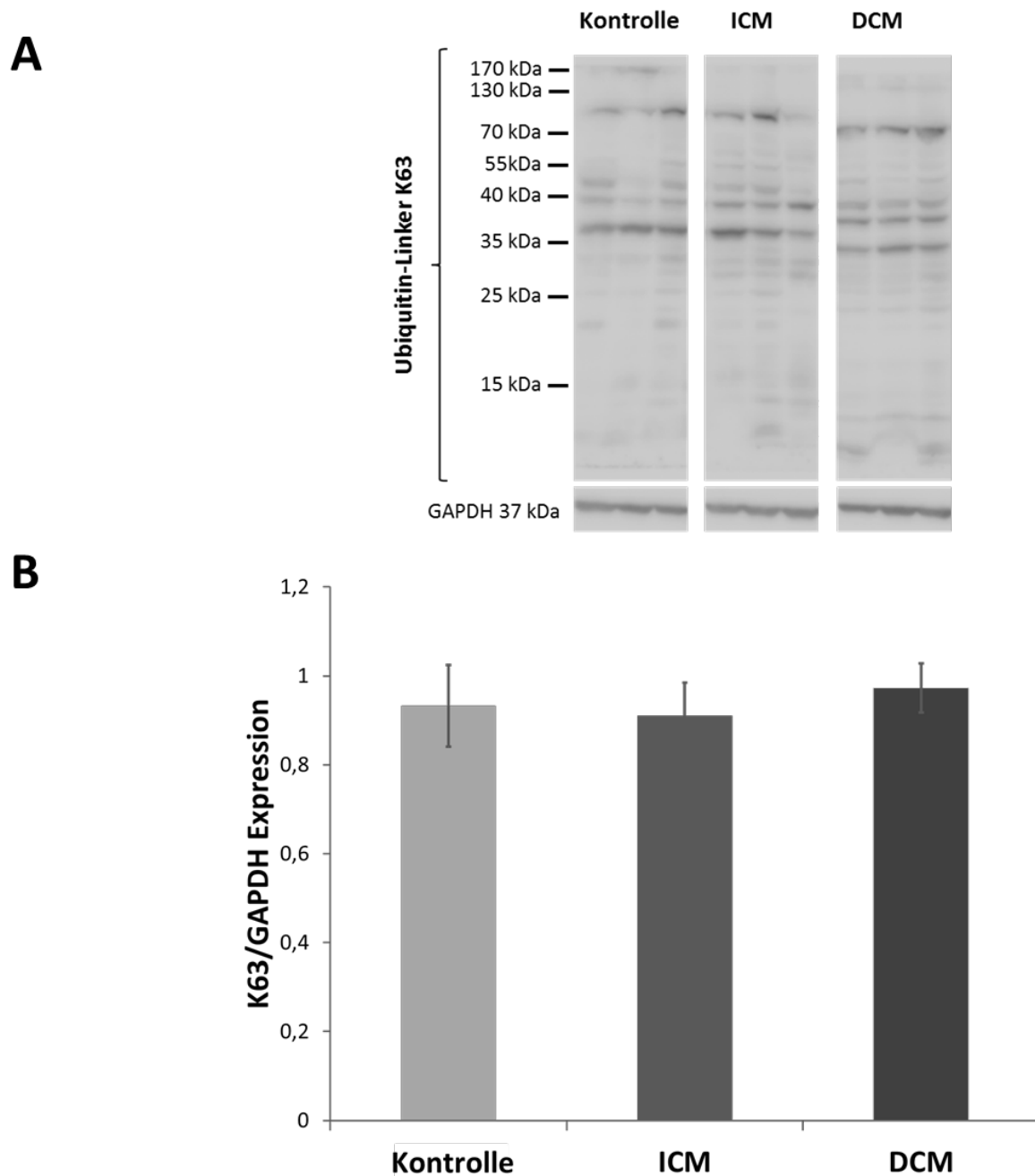
**A****B**

**Abb. 14: Western-Blot-Analyse von Multiubiquitin in humanem Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe.** Dargestellt sind ein exemplarischer Western Blot für Multiubiquitin (Multi-Ub) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) (A) sowie die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. für das Verhältnis von Multiubiquitin zu GAPDH (B). Sterne \* markieren signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) zwischen den Gruppen.

Die Analyse der Proteine, bei denen eine Ubiquitinierung an bestimmten Stellen, sogenannten Linkern erfolgte, zeigte keine signifikanten Unterschiede in der K48-Ubiquitinierung in ICM- und DCM-geschädigtem Myokard und der Kontrollgruppe (Kontrolle:  $0,96 \pm 0,06$ ; ICM:  $0,85 \pm 0,07$ ; DCM:  $1,04 \pm 0,07$ ;  $p=0,20$ ) (Abb. 15). Die K63-Ubiquitinierungen von Proteinen (Abb. 16) waren ebenfalls in allen Gruppen vergleichbar (Kontrolle:  $0,93 \pm 0,09$ , ICM:  $0,91 \pm 0,07$ , DCM:  $0,97 \pm 0,06$ ,  $p=0,79$ ).



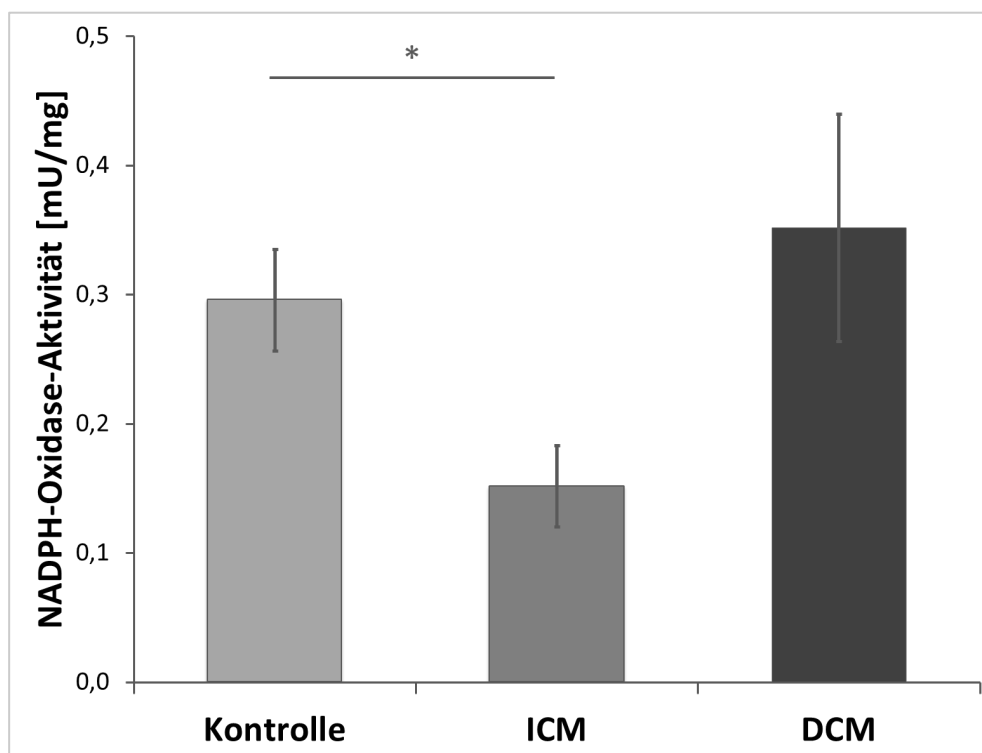
**Abb. 15: Western-Blot-Analyse von K48-Proteinubiquitinierungen im humanen Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe.** Dargestellt sind exemplarische Western Blots für K48-Ubiquitinlinker (A) sowie die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. für das Verhältnis von K48-Ubiquitinlinker zu Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (B).



**Abb. 16: Western-Blot-Analyse von K63-Proteinubiquitinierungen im humanen Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe.** Dargestellt sind exemplarische Western Blots für K63-Ubiquitinlinker (A) sowie die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. für das Verhältnis von K63-Ubiquitinlinker zu Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) (B).

### 5.5 Oxidativer Stress und Apoptose

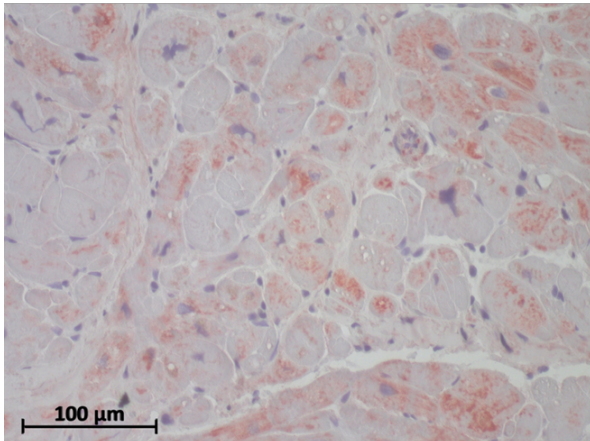
Die Quantifizierung der Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Oxidase-Aktivität (NADPH-Oxidase)- (Abb. 17) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,30\text{mU/mg} \pm 0,04\text{mU/mg}$ ) wies in ICM-geschädigtem Myokard ( $0,15\text{mU/mg} \pm 0,03\text{mU/mg}$ ) ( $p_{\text{Kontrolle vs. ICM}}=0,025$ ) eine geringere Aktivität und in DCM-geschädigtem Myokard eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität ( $0,35\text{mU/mg} \pm 0,09\text{mU/mg}$ ) auf ( $p_{\text{Kontrolle vs. DCM}}=0,91$ ).



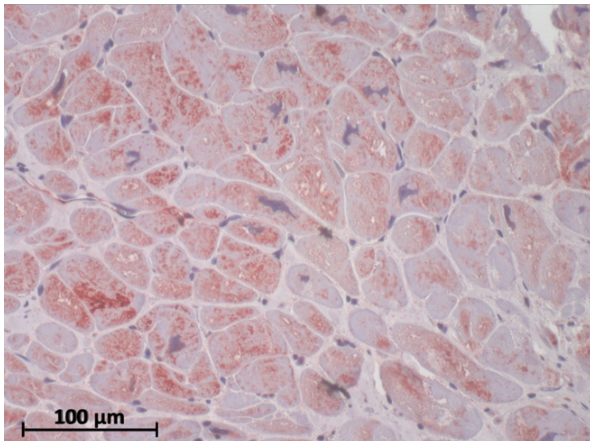
**Abb. 17:** Vergleich der NADPH-Oxidase-Aktivität in Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe. Sterne \* markieren signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) zwischen den Gruppen.

Da eine hohe NADPH-Oxidase-Aktivität ein Hinweis auf erhöhten zellulären oxidativen Stress ist, der wiederum zu Apoptose führen kann, wurde der Anteil der AIF-positiven Zellen an Gewebeschnitten untersucht. Der Anteil AIF-positiver Zellen unterschied sich nicht zwischen den untersuchten Gruppen (Kontrolle:  $57,88\% \pm 6,10\%$ ; ICM:  $59,18\% \pm 4,85\%$ ; DCM:  $67,68\% \pm 6,23\%$ ;  $p=0,437$ ) (Abb. 18 und 19).

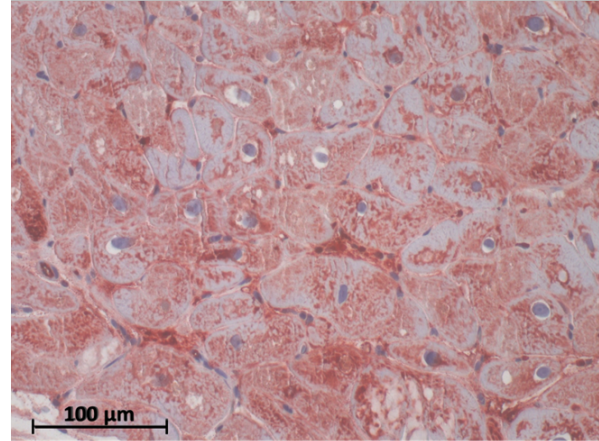
## Kontrolle



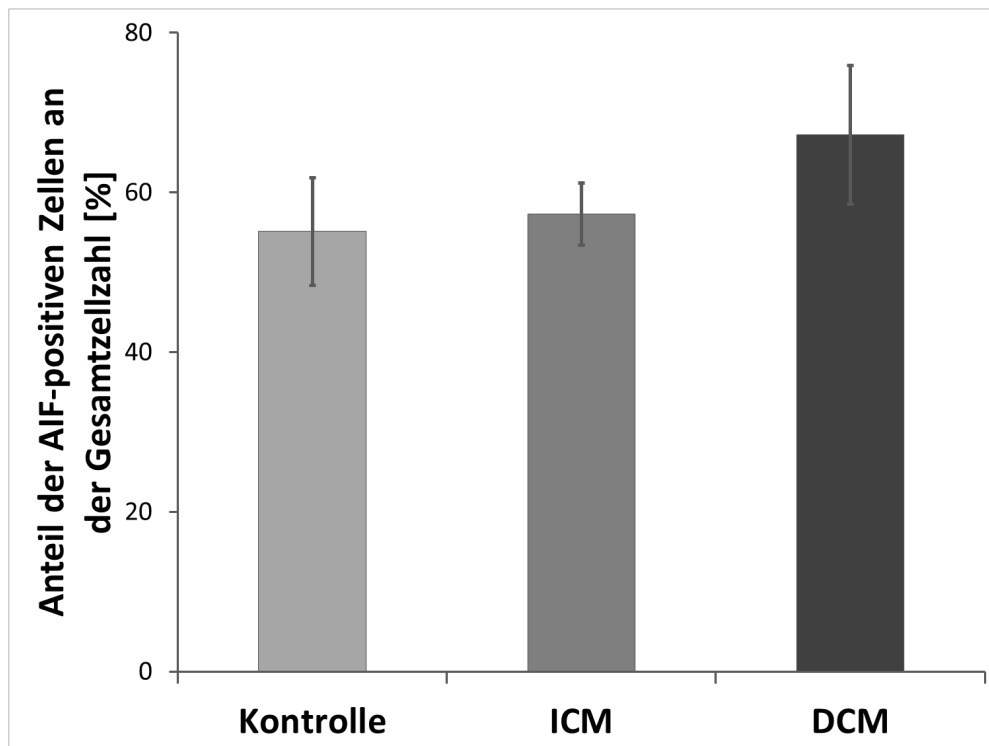
## ICM



## DCM



**Abb. 18:** Histologische Analyse der Expression des Apoptose-induzierenden Faktors AIF in humanem Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe. 3 µm-Schnitte des humanen Myokards wurden nach AIF-Färbung in 200facher Vergrößerung analysiert.



**Abb. 19:** Histologische Analyse der Expression des Apoptose-induzierenden Faktors AIF in humanem Myokard von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie einer Kontrollgruppe. Es wurde der Anteil der AIF-positiven Zellen dokumentiert.

Abschließend sind in Tab. 12 die Ergebnisse dieser Arbeit tabellarisch zusammengefasst.

**Tab. 12: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.** Die Pfeile zeigen die Veränderung in ICM- und DCM-geschädigtem Gewebe im Vergleich zu der Kontrollgruppe an.

	ICM	DCM	p-Wert des Globaltests
<b>Proteinbiosynthese</b>			
eIF4E	↔	↔	0,67
<b>Proteasomaktivität</b>			
Trypsin-ähnliche Aktivität	↔	↔	0,06
Chymotrypsin-ähnliche Aktivität	↔	↔	0,61
<b>E3-Ligasen</b>			
MAFbx-Expression	↔	↔	0,06
MuRF-1-Expression	↔	↔	0,62
<b>Ubiquitin-Maschinerie</b>			
Anteil Ubiquitin-positiver Zellen	↓	↓	0,05
Ubiquitin-positive Deposits	↓	↔	0,03
Multi-Ubiquitin	↔	↓	0,02
K48-Ubiquitinierung	↔	↔	0,20
K63-Ubiquitinierung	↔	↔	0,79
<b>Reaktive-Sauerstoffspezies</b>			
NADPH-Oxidase-Aktivität	↓	↔	0,01
<b>Apoptose</b>			
AIF	↔	↔	0,44

## 6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals die Unterschiede im UPS zwischen DCM und ICM im Vergleich zu einer Kontrollgruppe in humanem Myokardgewebe. Unterschiede und statistische Trends wurden für die Proteasomaktivität, die Expression der Herzmuskel-spezifischen E3-Ligase Mafbx sowie das Ubiquitinierungsmuster gefunden.

Die erste Komponente des UPS, das Proteasom, besitzt drei katalytische Aktivitäten, die spezifisch durch die Zugabe von Proteasom-Inhibitoren gehemmt werden können. Die Charakterisierung der ersten Komponente des UPS, dem Proteasom, zeigte geringe, nicht-signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. In ICM-geschädigtem Gewebe konnte eine eingeschränkte Proteasomaktivität des Trypsin-ähnlichen katalytischen Zentrums als statistischer Trend nachgewiesen werden. DCM-geschädigtes Gewebe zeigte hingegen keinerlei Einschränkung der katalytischen Zentren des Proteasoms.

Vorangegangene Untersuchungen der unterschiedlichen katalytischen Zentren des Proteasoms erbrachten unterschiedliche Ergebnisse. Kostin et al. zeigten 2003, dass zwischen herzinsuffizienten und nicht-herzinsuffizienten Geweben kein Unterschied in der Proteasom-Aktivität besteht<sup>17</sup>. Predmore konnte nachweisen, dass die Caspase- und die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz durch oxidative Veränderungen der Proteasom-Untereinheiten verringert ist.<sup>38</sup> In einer Studie von Baumgarten et al., konnte gezeigt werden, dass DCM-geschädigtes Gewebe im Vergleich zu nicht genutzten Spenderherzen einen Anstieg der Aktivität aller drei katalytischen Untereinheiten mit Trypsin-, Chymotrypsin- und Caspase-ähnlicher Aktivität aufwies.<sup>39</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Unterschiede zwischen der Trypsin- und der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms bei ICM- und DCM-Patienten und einer Kontrollgruppe untersucht, während sich vorangegangene Studien auf die Unterscheidung zwischen herzinsuffizienten und nicht-herzinsuffizienten Patienten oder DCM-Gewebe und einer nicht weiter spezifizierten Kontrollen konzentrierten.



Der Analyse der Caspase-ähnlichen Aktivität des Proteasoms wurde in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt. Die experimentelle Umsetzung der Quantifizierung der Caspase-ähnlichen Aktivität beinhaltet Fehlerquellen, sodass die Erhebung valider Daten nicht sichergestellt werden kann. Aus diesem Grund wurden diese Daten nicht in die Arbeit aufgenommen. Die Schwierigkeit des Nachweises der Proteasom-Aktivitäten im humanen Gewebe zeigte sich auch in anderen Arbeitsgruppen, die nicht alle drei katalytischen Untereinheiten untersuchten.

Tierexperimentelle Studien haben sich ebenfalls mit der Untersuchung der Proteasomaktivität im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz befasst. Hedhli et al. induzierten im Maus-Modell durch eine Aortenligatur eine DCM. Zwei Wochen nach Durchführung der Aortenligatur wurden der Untersuchungsgruppe täglich für sieben Tage der Proteasom-Inhibitor Epoxomicin, der spezifisch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms hemmt, appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt ein intraperitoneal injiziertes Placebo. Die Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Epoxomicin verringerte die Proteasom-Aktivität sowie die Apoptose-Rate und führte zu einer stabileren Ejektionsfraktion.<sup>40</sup> Weiterhin zeigte die mit dem Proteasom-Inhibitor behandelte Gruppe keine Anzeichen für eine Herzinsuffizienz.<sup>40</sup>

Die Arbeitsgruppe um Chen zeigte in einem Ratten-DCM-Modell eine Verlangsamung der durch die Druckbelastung induzierten kardialen Hypertrophie. In diesem Modell wurden in den Ratten ebenfalls durch eine Aortenligatur eine DCM induziert, die ab dem dritten postoperativen Tag mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 behandelt wurde. MG-132 wurde über einen Zeitraum von 8 Wochen täglich intraperitoneal injiziert.<sup>41</sup> Ma et al. konnten ebenfalls in einem Ratten-DCM-Modell zeigen, dass eine Hemmung des Proteasoms mit MG-132 in einer späten Phase der dauerhaften Druckbelastung zu einem verringerten Fortschreiten von kardialer Fibrosierung und der Herzinsuffizienz führt.<sup>42</sup> Diese tierexperimentellen Studien zeigten, dass durch die Hemmung des Proteasoms das Fortschreiten einer bestehenden Herzinsuffizienz verhindert werden konnte und dem Proteasom eine zentrale Rolle in der Ausbildung einer Herzinsuffizienz zuzuweisen ist. Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten in humanem Gewebe zeigte sich bei fortgeschrittener DCM

keine Einschränkung der Aktivität des Proteasoms. Es gibt keine vergleichbaren Studien an humanem Gewebe oder im Tiermodell, welche die Bedeutung der Hemmung einzelner Aktivitätszentren erklären. Lediglich Kisselev et al. zeigten in *Saccharomyces cerevisiae*, dass die relative Bedeutung des Aktivitätszentrums vom jeweiligen Substrat abhängig ist. Ferner fanden sie heraus, dass erst die Inhibierung aller drei Aktivitätszentren zu einem signifikant veränderten Proteinabbau führt.<sup>43</sup> Inwiefern die in dieser Arbeit beschriebene Verringerung der Trypsin-ähnlichen Aktivität in ICM-Patienten Auswirkungen auf den Proteinabbau hat, kann mit den vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden und sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Hinsichtlich der Ausbildung einer Herzinsuffizienz und der beteiligten zellulären Prozessen scheinen Spezies-spezifische Unterschiede zu bestehen. Herrmann et al. zeigten im Schweine-Modell, dass eine Inhibition des Proteasoms durch MLN-273 eine kardiale Dysfunktion in gesunden Schweinen induziert.<sup>44</sup> Drei Monate alten, gesunden Schweinen wurde zweimal wöchentlich der Proteasom-Inhibitor MLN-273 injiziert. Dies führte zu einer 77% niedrigeren Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Nach 11 Wochen konnte in der Proteasom-Inhibitor-behandelten Gruppe eine niedrigere Auswurfleistung, eine erhöhte Masse des linken Ventrikels und eine perivaskuläre und interstitielle Fibrose nachgewiesen werden.

Die Übertragung der Ergebnisse auf das humane Proteasom scheint nicht uneingeschränkt möglich zu sein. Während in Nagetiermodellen eine Herzinsuffizienz durch Zugabe von Proteasom-Inhibitoren verhindert werden konnte, wurde sie im Schweine-Modell induziert. Der Zeitpunkt der Messung der Proteasomaktivität scheint ebenfalls entscheidend zu sein und sollte beim Vergleich der wissenschaftlichen Daten beachtet werden.

Im Menschen werden Proteasom-Inhibitoren vor allem in der Onkologie angewendet. In Europa und den USA sind derzeit die Proteasom-Inhibitoren Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib für die Behandlung von Multiplen Myelomen und Mantel-Zell-Lymphomen zugelassen. In verschiedenen klinischen Studien wurde gezeigt, dass die Behandlung mit den Proteasom-Inhibitoren Bortezomib

und Carfilzomib zu einer vermehrten Ausprägung von Symptomen einer Herzinsuffizienz wie zum Beispiel Dyspnoe und peripheren Ödeme führen.<sup>45</sup>

Die Endeavor Studie aus dem Jahr 2016 zeigte im direkten Vergleich von Bortezomib und Carfilzomib, dass Patienten, die mit Carfilzomib behandelt wurden, deutlich häufiger schweres Herzversagen entwickeln.<sup>45</sup> Für den oralen Proteasom-Inhibitor Ixazomib wurde ebenfalls eine erhöhte Rate an Symptomen, die mit Herzinsuffizienz assoziiert sind, beschrieben.<sup>45</sup>

Die zweite Komponente des UPS, die Ubiquitinierung, ist eine mehrschrittige und energieabhängige Enzymkaskade, an deren Ende ein Ubiquitin an das Aminoende eines Lysinrestes übertragen wird. Es sind bereits verschiedene Ubiquitinierungsarten bekannt, die den Abbauweg für das ubiquitinierte Protein festlegen.<sup>27</sup> Während eine Ubiquitinierung am Lysin 48 (K48) das Substrat für den proteasomalen Abbau markiert und für die Transkriptionsregulation verantwortlich ist, ist die Lysin 63-Ubiquitinierung (K63) mit Autophagie-assoziiertem Proteinabbau, Signaltransduktion und DNA-Replikation und -reparatur verknüpft.<sup>28,29</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abnahme des freien Ubiquitins und eine signifikant geringere Menge von Ubiquitin-positiven Depots in ICM- und DCM-Gewebe nachgewiesen. Kein Unterschied wurde für die Multi-, K48- und K63-Ubiquitinierung in ICM-Gewebe festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigte sich in DCM-Gewebe eine Abnahme des Multi-Ubiquitins. Die Ubiquitinierung in ICM- und DCM-Patienten wurde immunhistochemisch bisher kaum untersucht. Ein Großteil der bekannten Studien wies einen Anstieg von Ubiquitin-positiven Zellen in herzinsuffizienten Patienten nach. Kostin et al. zeigten eine Hyperubiquitinierung und eine erhöhte Anzahl von Ubiquitin-Depots in DCM-Patienten.<sup>17</sup> Es wurden Gewebe des linken Ventrikels von explantierten Herzen DCM-erkrankter Patienten sowie einer Kontrollgruppe, die aus nicht genutzten Spenderherzen und Gewebe von Patienten mit einer Mitralklappenstenose bestand, untersucht. In der Arbeit von Weekes et al. wurde ein Anstieg der Ubiquitin-Protein-Konjugation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe in einem Western-Blot-Experiment gezeigt. In dieser Arbeit wurde das Gewebe von explantierten DCM-geschädigten Herzen mit nicht verwendeten Spenderherzen verglichen.<sup>49</sup>

Otsuka et al. untersuchten immunhistochemisch Gewebe von DCM-Patienten, das während einer Ventrikuloplastie gewonnen wurde. Als Kontrolle dienten nicht verwendete Spenderherzen. Auch Otsuka et al. konnten einen Ubiquitin-Anstieg in DCM-Gewebe zeigen.<sup>16</sup> In den genannten Studien wurden Spenderherzen, die nicht für Transplantationen zur Verfügung standen, als Kontrollen verwendet. Hierzu sollte angemerkt werden, dass in den jeweiligen Studien nicht diskutiert wurde, aus welchem Grund die Herzen nicht für die Transplantation geeignet waren. Sollten die Herzen aus qualitativer Sicht unbrauchbar für Transplantationen gewesen sein, sind diese Gewebe u. U. auch als Kontrolle ungeeignet. Dies könnte zu einer Verzerrung von Ergebnissen führen. Des Weiteren ist die Wahl der verwendeten Antikörper für immunhistologische und proteinbiochemische Analysen zu beachten. Keine der genannten Arbeiten machte detaillierte Angaben zu den verwendeten Ubiquitin-Antikörpern. Ubiquitin-Antikörper verschiedener Firmen unterscheiden sich stark hinsichtlich des zu bindenden Epitops. Während manche Antikörper nicht zwischen Mono-, Multi- und Polyubiquitinierungen unterscheiden, detektieren andere ausschließlich Mono- oder Multiubiquitin. Zusätzlich ist zu beachten, dass Antikörper auch zwischen freiem und gebundenem Monoubiquitin unterscheiden sollten. Außerdem kann die Anfärbbarkeit von stark geschädigtem Gewebe verändert sein.<sup>46</sup> Da es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten Gewebe um insuffizientes Gewebe im Endstadium handelt, ist es nicht auszuschließen, dass die Anfärbbarkeit aufgrund der Zerstörung des Gewebes vermindert war.

Die vorliegende Arbeit zeigte außerdem eine signifikant geringere Anzahl an Ubiquitin-positiven Zellen sowie von Ubiquitin-Depots in ICM und DCM im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das System aufgrund der weit fortgeschrittenen Krankheit herunterreguliert wurde und nur wenige Proteine ubiquitiniert werden. Diese Vermutung wird von den Ergebnissen dieser Arbeit zur bereits beschriebenen Proteasomaktivität gestützt, die in ICM-Gewebe ebenfalls vermindert ist.

Neben der Erforschung von Ubiquitin mittels Immunhistochemie kann die Quantifizierung von Multi-Ubiquitin mittels Western-Blot-Analyse ebenfalls einen wertvollen Beitrag zur Erforschung von

Veränderungen im UPS beitragen. In der vorliegenden Arbeit war der Anteil von Multi-Ubiquitin in DCM-geschädigtem Gewebe signifikant vermindert, blieb in ICM-geschädigtem Gewebe jedoch unverändert. In einer Studie von Weekes et al. wurde im Gegensatz dazu festgestellt, dass es einen zweimal so hohen Anstieg der Multi-Ubiquitinierung in DCM und einen fünfmal so hohen Anstieg in der ICM-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe gab.<sup>47</sup> Der Unterschied zwischen immunhistochemischen und biochemischen Studien an pathologisch verändertem Gewebe könnte darin begründet sein, dass verschiedene Antikörper zur Charakterisierung der Mono-, Multi- oder Polyubiquitinierung benötigt werden. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper detektierte Multi-Ubiquitin, wohingegen der Antikörper in Weekes nicht weiter spezifiziert wurde. Shabek et al. zeigten außerdem, dass eine Mono-Ubiquitinierung fehlgefaltete Proteine dem proteasomalen Abbau zuführt, wenn diese kleiner als 150 Aminosäuren groß sind.<sup>48</sup> 50% der humanen Proteine werden mono-/multi-monoubiquitiniert. Da es aktuell keinen kommerziell erhältlichen Antikörper gibt, der humanes Monoubiquitin detektiert, musste auf die Untersuchung von monoubiquitinierten Proteinen verzichtet werden. Monoubiquitinierte Proteine spielen jedoch eine Rolle in Signalwegen bei oxidativem Stress<sup>49</sup>, sodass künftig von Interesse sein könnte auch die Monoubiquitinierung von Proteinen in ICM- und DCM-geschädigten Gewebe zu untersuchen und auf diese Weise eine mögliche Verbindung zu den bereits beschriebenen Ergebnissen und der Rolle von Monoubiquitinierungen bei oxidativem Stress ziehen zu können.

Zum besseren Verständnis der Ubiquitinierungsvorgänge bei einer fortgeschrittenen ICM und DCM wurde ebenfalls die Art der Ubiquitinierung untersucht, da diese Rückschlüsse auf den Abbauweg zulässt. Proteine, die über das ubiquitäre Lysin 48 (K48) verlinkt sind, werden dem proteasomalen Abbau zugeführt, wohingegen Proteine, die über das ubiquitäre Lysin 63 (K63) verlinkt sind, durch autophagische Prozesse abgebaut werden. Die Ubiquitinketten werden über eine Isopeptidbindung zwischen dem jeweiligen Lysinrest des Ubiquitins und dem C-terminalen Glycin-Rest des folgenden Ubiquitin-Moleküls gebildet. So können, abhängig vom jeweiligen Lysin-Rest des Ubiquitins, verschiedene Polyubiquitin-Ketten gebildet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte kein

Unterschied für die K48- und K63-Ubiquitinierung in ICM- und DCM-geschädigtem Gewebe nachgewiesen werden. Dies könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass Autophagie im Endstadium dieser beiden Kardiomyopathien keine vermehrte Rolle spielt. Es gibt keine vergleichbaren Studien, die die Ubiquitin-Linker K48 und K63 in humanem ICM- und DCM-Gewebe untersucht haben.

Die dritte Komponente des UPS, die Ubiquitinierungs-Maschinerie, wurde durch die Untersuchung der E3-Ligasen MAFbx und MuRF-1 charakterisiert. Die E3-Ligasen rekrutieren ein spezifisches Substrat und dienen innerhalb der Enzymkaskade als Gerüst für die Übertragung des Ubiquitins vom vorhergehenden E2-Ubiquitin-Komplex auf das zu ubiquitinierende Substrat. Bislang sind über 600 hochspezifische E3-Ligasen bekannt, wobei im Herzmuskel neun E3-Ligasen identifiziert wurden. Zu diesen gehören *muscle-ring-finger-1* (MuRF-1), MuRF-2, MuRF-3, *muscle atrophy F-box* (MAFBx), C-terminus of heat shock protein 70-interacting protein (CHIP), murine double minute (MDM2), *Casitas b-lineage lymphoma* (c-Cb1), *ubiquitin-protein ligase* E3A (UBE3A/E6AP) und *cellular inhibitor of apoptosis* (cIAP).<sup>50</sup>

Die Studienlage zur Expression der E3-Ligasen ist nicht eindeutig, da bisherige Studien entweder mit Tiermodellen oder mit humanem Herzgewebe arbeiteten, wobei hierbei nur zwischen herzinsuffizient und nicht-herzinsuffizient unterschieden wurde. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die Expression der E3-Ligasen MuRF-1 und MAFbx in humanem ICM- und DCM-Gewebe. Western-Blot-Analysen ergaben, dass die Expression von MAFbx als statistischer Trend nicht jedoch von MuRF-1 in DCM-geschädigtem Gewebe verringert ist. MAFbx ist ein wichtiger Regulator des kardialen Remodelings, da es in der Lage ist die Calcium-abhängige Phosphatase Calcineurin A zu ubiquitinieren, dem Abbau zuzuführen und somit kardiale Hypertrophie zu verhindern.<sup>51</sup> E3-Ligasen katalysieren den entscheidenden Schritt der Ubiquitinierung des abzubauenen Substrats und spielen somit eine zentrale Rolle im UPS. Diese Arbeit zeigt eine geringere Anzahl an Ubiquitin-positiven Zellen, Ubiquitin-positiven-Depots sowie eine geringere Konzentration von Multi-Ubiquitin in DCM-geschädigtem Gewebe. Diese Beobachtung passt zu der verringerten Expression von MAFbx

in DCM-geschädigten Gewebe, da hier möglicherweise der entscheidende Schritt der Ubiquitinierung fehlt, sodass insgesamt immunhistochemisch und auch in Western-Blot-Experimenten weniger Ubiquitin nachgewiesen werden konnte. MAFbx ist zudem ein Inhibitor der physiologischen, adaptiven Hypertrophie, da es die Aktivität von FoxO1 und FoxO3a erhöht, die als Transkriptionsfaktoren Gene aktivieren, die für den Muskelabbau verantwortlich sind.<sup>52</sup> Das Sarkomer-assoziierte Protein MuRF-1 ist ebenfalls ein Inhibitor der pathologischen Hypertrophie.<sup>50</sup>

Basulabramanian et al. fanden in einem Herzinsuffizienz-Modell bei Katzen, in dem durch den Verschluss der Pulmonalarterie eine Rechtsherzbelastung induziert wurde, keinen Anstieg der MuRF-1-Expression.<sup>53</sup> Conraads et al. verglichen in einer Studie das Myokard von Patienten mit Myokardinfarkt, der nicht länger als zwei Wochen vor Probenentnahme stattgefunden haben durfte, und Patienten, die sich einer Koronararterien-Bypass-Operation unterziehen musste. Den Patienten wurde Myokard des linken Ventrikels entnommen, das kontralateral des Infarktareals lag. Conraads konnte eine signifikant geringere Expression von MuRF-1 und MAFbx bei Patienten mit Myokardinfarkt beobachten.<sup>54</sup> Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass die Expression der beiden E3-Ligasen präventiv in dem nicht betroffenen Infarktareal herunterreguliert werden, um Hypertrophie vorzubeugen. Wie schon für MAFbx beschrieben, steht die Vergleichbarkeit der Studien untereinander und zu dieser Studie in Frage, da sich die experimentellen Modelle unterscheiden. Für die Zukunft ist es wichtig bei einer weiteren Erforschung des UPS in ICM- und DCM-Gewebe humane Proben zu verwenden, da eine Übertragungen von Daten aus Tier- oder Zellkulturexperimenten auf den Menschen eingeschränkt sein könnte.

Ischämie in myokardialen Gewebe führt zu einem Anstieg von Sauerstoffradikalen, welche die Entstehung von hochreaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren und erheblichen Schaden an Zellkomponenten verursachen.<sup>55</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität als indirektes Maß für die Entstehung von ROS untersucht. Hier konnte eine verminderte Aktivität in ICM-geschädigtem Gewebe gezeigt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Annahme überein, dass die NAD(P)H-Oxidase reaktive Sauerstoffspezies produziert, die zu oxidativem Stress und

schließlich zur Apoptose führen. Es wurde außerdem angenommen, dass die Akkumulierung von oxidierten Proteinen zu einer Inhibierung des Proteasoms durch weitere Akkumulierung von geschädigten Proteinen führt, da das Proteasom diese nicht abbauen kann.<sup>56</sup> Die erhöhte Konzentration an ROS in der Zelle führt außerdem zu Apoptose. Tsukamoto et al. zeigten, dass Apoptose von Kardiomyozyten zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion bei zu hoher Druckbelastung führt.<sup>57</sup> Außerdem zeigte sich eine eingeschränkte Proteasom-Aktivität mit einhergehender Apoptoserate der Kardiomyozyten bevor die kardiale Dysfunktion auftrat.<sup>57</sup> Die vorliegende Arbeit weist keine erhöhte Apoptose-Rate in ICM- und DCM-geschädigten Gewebe nach. Apoptose kann über intrinsische und extrinsische Wege induziert werden. Der intrinsische Weg kann z. B. über eine hohe intrazelluläre ROS-Last induziert werden und zur Zerstörung der Mitochondrien und somit zur Freisetzung von Cytochrom c führen. Cytochrom c ist ein Enzym der inneren Mitochondrienmembran. Eine erhöhte zytosolische Cytochrom c-Konzentration ist ein Indiz für eine gesteigerte Instabilisierung der Mitochondrien. Im Zytosol bindet Cytochrom c an *apoptotic protease activating factor 1* (APAF 1) und bildet zusammen mit diesem das Apoptosom, welches eine enzymatische Kaskade bestehend aus Caspase-Enzymen in Gang setzt<sup>58</sup>. Zunächst wird die Procaspase 9 zur aktiven Caspase 9 umgewandelt, die die ausführende Caspase 3 aktiviert und somit zur Apoptose führt. Die Caspase-Kaskade kann auch über den extrinsischen Weg zum Beispiel über die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor aktiviert werden. Dies führt zur intrazellulären Bildung des *death inducing signalling complex* (DISC). Im Zytosol wird die Procaspase 8 durch DISC zur aktiven Caspase 8 umgewandelt, die ebenfalls die Caspase 3 aktivieren kann. Experimentelle Arbeiten im herzchirurgischen Forschungslabor, die sich an die vorliegende Arbeit anschlossen, zeigten, dass die Konzentration von zytosolisch gemessenem Cytochrom c in DCM-geschädigten Gewebe im Vergleich zu ICM-geschädigten Gewebe und einer Kontrollgruppe signifikant erhöht ist. Die Induktion des extrinsischen Apoptose-Wegs konnte ausgeschlossen werden, da sich die Caspase 8-Konzentrationen nicht unterschieden. Allerdings konnte ein signifikanter Anstieg der aktiven Caspase 9 in DCM-geschädigtem Gewebe gezeigt werden, der nicht zu einer Erhöhung der aktiven



Caspase 3 und auch nicht zu einer Erhöhung der Apoptoserate führte. Dies lässt den Schluss zu, dass ROS in DCM-geschädigtem Gewebe zu einer mitochondrialen Instabilität führt. Dieses Ergebnis stimmt mit dem der vorliegenden Arbeit überein, dass die ROS-Last in DCM-Gewebe erhöht ist.

Der Apoptose-induzierende Faktor AIF ist ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert und führt Caspase-unabhängig zur Apoptose. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied in der Anzahl AIF-positiver Zellen in ICM- und DCM-geschädigten Gewebe gezeigt werden. Dass kein Anhalt für eine erhöhte Apoptose-Rate in beiden Arbeiten gezeigt wurde, könnte der Tatsache geschuldet sein, dass es sich bei dem untersuchten Gewebe um Herzinsuffizienz im Endstadium handelt und somit apoptotische Vorgänge weitestgehend abgeschlossen sind. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass Apoptose in einem früheren Krankheitsstadium eine Rolle spielt.

Trotz der neuen Erkenntnisse, die zum besseren Verständnis des UPS in ICM- und DCM-geschädigten Gewebe beigetragen haben, müssen die Ergebnisse kritisch im Hinblick auf gewisse Limitationen betrachtet werden. Zum einen ist es sehr schwierig eine gesunde Kontrollgruppe zu definieren. Gesundes, humanes Myokard ist hier die limitierende Ressource. Aufgrund des Mangels an Spenderherzen, stehen diese zu Forschungszwecken nur selten zur Verfügung. Des Weiteren stehen Myokardbiopsien herzgesunder Menschen nur in sehr geringem Maß zur Verfügung. Dies ist ein Grund dafür, warum es so schwierig ist Längsschnittstudien durchzuführen, um das UPS im Krankheitsverlauf zu untersuchen. ICM- und DCM-Patienten werden laut Leitlinie erst dann operiert werden, wenn sich ihre Herzinsuffizienz bereits im Endstadium befindet, sodass keine Proben von Patienten mit einer schwächer ausgeprägten Herzinsuffizienz zur Verfügung stehen. Bei der Untersuchung von Kardiomyopathien stellt dies eines der Hauptprobleme dar, da zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht klar ist, ob es sich bei den Veränderungen der UPS-Aktivität um kausale oder kompensatorische Mechanismen handelt, die zu Veränderungen des Myokards führen. Ferner unterliegt die Arbeit auch methodischen Beschränkungen, da das UPS und seine Regulation noch nicht umfassend verstanden sind. Als Beispiel sollen hier die E3-Ligasen genannt werden: bisher ist die genaue Anzahl der herzspezifisch exprimierten E3-Ligasen nicht bekannt. In der vorliegenden

Arbeit konnten keine DUBs untersucht werden. DUBs führen zur Deubiquitinierung der Proteine und verhindern so einen proteasomalen Abbau. DUBs sind regulatorische Elemente im De-/Ubiquitinierungsprozess und ihre Analyse würde weiteren Aufschluss darüber geben, wie kardiales Remodeling entgegengewirkt werden kann. Ferner wäre es sinnvoll eine mRNA-Analyse durchzuführen. Dies könnte helfen herauszufinden, ob die beobachteten Veränderungen im UPS auf RNA- oder Proteinebene liegen. In der vorliegenden Arbeit wurden Surrogatparameter untersucht. Die gemessenen Parameter geben zwar Hinweise auf eine Korrelation zwischen der Funktionsweise des UPS und ICM- und DCM-geschädigten Gewebe im Endstadium, allerdings gilt es den genauen Zusammenhang noch weiter zu klären, um die Sensitivität der untersuchten Tests beurteilen zu können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Unterschiede und statistische Trends im humanen UPS bei Patienten mit einer ICM und DCM nachgewiesen wurden. Diese Unterschiede betreffen die Proteasomaktivität, die Expression der Herzmuskel-spezifischen E3-Ligase MAFbx sowie das Ubiquitinierungsmuster. Die Veränderungen des UPS bei den verschiedenen Kardiomyopathieformen machen deutlich, dass für eine therapeutische Intervention verschiedene Ansatzpunkte gewählt werden müssen. Weiterführende Forschungsarbeit muss betrieben werden, um potenziellen Mechanismen bei der Entstehung von Kardiomyopathien herauszuarbeiten. Hierbei könnte die Beteiligung an der Studie „Vergleich zwischen frühzeitiger und ggf. Notfall-Implantation eines Herzunterstützungssystems bei Patienten auf der Warteliste zur Herztransplantation - VAD-Studie“ des „Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.v.“ von Vorteil sein. In dieser randomisierten, multizentrischen Studie wird aktuell untersucht, ob die Implantation des LVAD bei herzinsuffizienten Patienten zu einem früheren Zeitpunkt ein besseres Outcome hat. Durch die frühere Implantation des LVADs stünde Gewebe zur Verfügung, um das UPS in einem früheren Stadium der Herzinsuffizienz zu untersuchen. Mit dem Wissen über die Funktionsweise des UPS in einem frühen Krankheitsstadium und im Endstadium der Herzinsuffizienz hätte man Ansatzpunkte, um in Zukunft medikamentöse Therapieoptionen für die Herzinsuffizienz zu entwickeln.

## **7 Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit charakterisiert den Ist-Zustand des UPS in Kardiomyopathie-geschädigtem Gewebe und konnte erstmals Unterschiede im humanen UPS von Patienten mit ICM und DCM zeigen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung sowie die Expression von Ubiquitin in ICM und DCM verändert ist. Außerdem zeigten sich statistische Trends für eine reduzierte Proteasomaktivität in ICM- sowie eine verringerte MAFbx-Expression in DCM-geschädigtem Myokard. Darüber hinaus wurde eine verringerte ROS-Produktion in ICM-geschädigtem Myokard, jedoch keine Veränderungen bezüglich der Apoptoserate nach histologischer Analyse des Apoptose-induzierenden Faktors AIF nachgewiesen werden. Die Arbeit zeigt erstmalig, dass sich die Aktivität und Expression verschiedener Komponenten des UPS in ICM und DCM unterscheiden. Deshalb eröffnet die Unterscheidung in ICM- und DCM-Gewebe verschiedene Ansatzpunkte für eine therapeutische Intervention.

Mit der vorliegenden Arbeit als Grundlage und dem neugewonnen Wissen darüber, wie sich das UPS bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz bei ICM- und DCM-Patienten verändert, kann weitere Forschungsarbeit betrieben werden, um potenziellen Mechanismen bei der Entstehung von Kardiomyopathien herauszuarbeiten. Mit dem Wissen über die Funktionsweise des UPS in verschiedenen Krankheitsstadien der Herzinsuffizienz bei ICM und DCM hätte man Ansatzpunkte, um in Zukunft medikamentöse Therapieoptionen für die Herzinsuffizienz zu entwickeln, um den Bedarf an Spenderherzen zukünftig senken zu können.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006;113(14):1807–16.
2. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980;44(6):672–3.
3. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93(5):841–2.
4. Arbustini E, Narula N, Dec GW, et al. The MOGE(S) classification for a phenotype-genotype nomenclature of cardiomyopathy: endorsed by the World Heart Federation. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(22):2046–72.
5. Taylor MRG, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:27.
6. Wexler RK, Elton T, Pleister A, Feldman D. Cardiomyopathy: an overview. *Am Fam Physician* 2009;79(9):778–84.
7. Briceno N, Schuster A, Lumley M, Perera D. Ischaemic cardiomyopathy: pathophysiology, assessment and the role of revascularisation. *Heart Br Card Soc* 2016;102(5):397–406.
8. Candell-Riera J, Romero-Farina G, Aguadé-Bruix S, Castell-Conesa J. Ischemic Cardiomyopathy: A Clinical Nuclear Cardiology Perspective. *Rev Esp Cardiol Engl Ed* 2009;62(08):903–17.

9. Bonow, Mann, Zipes, Libby. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 9. Auflage. Saunders; 2011.
10. Drews O, Taegtmeyer H. Targeting the ubiquitin-proteasome system in heart disease: the basis for new therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal* 2014;21(17):2322–43.
11. Gaudron P, Kugler I, Hu K, Bauer W, Eilles C, Ertl G. Time course of cardiac structural, functional and electrical changes in asymptomatic patients after myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(1):33–40.
12. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation* 2000;101(25):2981.
13. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation* 2013;128(4):388–400.
14. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2016;133(4):e38-360.
15. Pagan J, Seto T, Pagano M, Cittadini A. Role of the ubiquitin proteasome system in the heart. *Circ Res* 2013;112(7):1046–58.
16. Otsuka K, Terasaki F, Shimomura H, et al. Enhanced expression of the ubiquitin-proteasome system in the myocardium from patients with dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: an immunohistochemical study with special reference to oxidative stress. *Heart Vessels* 2010;25(6):474–84.
17. Kostin S, Pool L, Elsasser A, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 2003;92(7):715–24.
18. Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(5):606–16.

19. Calise J, Powell SR. The ubiquitin proteasome system and myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304(3):H337-349.
20. Stadtmueller BM, Hill CP. Proteasome activators. *Mol Cell* 2011;41(1):8–19.
21. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 2004;4(5):349–60.
22. Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 2005;24(19):3353–9.
23. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72(1):11–5.
24. Kimura Y, Tanaka K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem (Tokyo)* 2010;147(6):793–8.
25. Deshaies RJ, Joazeiro CAP. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 2009;78:399–434.
26. Schulman BA. Twists and turns in ubiquitin-like protein conjugation cascades. *Protein Sci Publ Protein Soc* 2011;20(12):1941–54.
27. Wenzel DM, Stoll KE, Klevit RE. E2s: structurally economical and functionally replete. *Biochem J* 2011;433(1):31–42.
28. Ferreira JV, Soares AR, Ramalho JS, Pereira P, Girao H. K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by Chaperone-Mediated Autophagy. *Sci Rep* 2015;5:10210.
29. McKeon JE, Sha D, Li L, Chin L-S. Parkin-mediated K63-polyubiquitination targets ubiquitin C-terminal hydrolase L1 for degradation by the autophagy-lysosome system. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2015;72(9):1811–24.
30. Wei R, Liu X, Yu W, et al. Deubiquitinases in cancer. *Oncotarget* 2015;6(15):12872–89.

31. Komander D, Clague MJ, Urbe S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(8):550–63.
32. Fraile JM, Quesada V, Rodriguez D, Freije JMP, Lopez-Otin C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* 2012;31(19):2373–88.
33. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2017. 2017; Available from: [https://www.dso.de/uploads/tx\\_dsodl/JB\\_2017\\_web\\_01.pdf](https://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/JB_2017_web_01.pdf)
34. Barac YD, Emrich F, Krutzwald-Josefson E, et al. The ubiquitin-proteasome system: A potential therapeutic target for heart failure. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2017;36(7):708–14.
35. Wohlschlaeger J, Sixt SU, Stoeppler T, et al. Ventricular unloading is associated with increased 20s proteasome protein expression in the myocardium. *J Heart Lung Transplant* 2010;29(1):125–32.
36. Mann DL, Lee RJ, Coats AJS, et al. One-year follow-up results from AUGMENT-HF: a multicentre randomized controlled clinical trial of the efficacy of left ventricular augmentation with Algisyl in the treatment of heart failure. *Eur J Heart Fail* 2016;18(3):314–25.
37. Schmid C. Leitfaden Erwachsenenherzchirurgie. 3. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2014.
38. Predmore JM, Wang P, Davis F, et al. Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation* 2010;121(8):997–1004.
39. Baumgarten A, Bang C, Tschirner A, et al. TWIST1 regulates the activity of ubiquitin proteasome system via the miR-199/214 cluster in human end-stage dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2013;168(2):1447–52.
40. Hedhli N, Wang L, Wang Q, et al. Proteasome activation during cardiac hypertrophy by the chaperone H11 Kinase/Hsp22. *Cardiovasc Res* 2008;77(3):497–505.

41. Chen B, Ma Y, Meng R, et al. MG132, a proteasome inhibitor, attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy in rats by modulation of mitogen-activated protein kinase signals. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010;42(4):253–8.
42. Ma Y, Chen Y, Yang Y, et al. Proteasome inhibition attenuates heart failure during the late stages of pressure overload through alterations in collagen expression. *Biochem Pharmacol* 2013;85(2):223–33.
43. Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 2006;281(13):8582–90.
44. Herrmann J, Wohler C, Saguner AM, et al. Primary proteasome inhibition results in cardiac dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2013;15(6):614–23.
45. Koulaouzidis G, Lyon AR. Proteasome Inhibitors as a Potential Cause of Heart Failure. *Heart Fail Clin* 2017;13(2):289–95.
46. National Society for Histotechnology. Guidelines For Hematoxylin & Eosin Staining. 2001
47. Weekes J, Morrison K, Mullen A, Wait R, Barton P, Dunn MJ. Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics* 2003;3(2):208–16.
48. Shabek N, Herman-Bachinsky Y, Buchsbaum S, et al. The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation. *Mol Cell* 2012;48(1):87–97.
49. Saeki Y. Ubiquitin recognition by the proteasome. *J Biochem (Tokyo)* 2017;161(2):113–24.
50. Willis MS, Bevilacqua A, Pulinilkunnil T, Kienesberger P, Tannu M, Patterson C. The role of ubiquitin ligases in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol* 2014;71:43–53.



51. Li H-H, Kedar V, Zhang C, et al. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest* 2004;114(8):1058–71.
52. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell* 2004;117(3):399–412.
53. Balasubramanian S, Mani S, Shiraishi H, et al. Enhanced ubiquitination of cytoskeletal proteins in pressure overloaded myocardium is accompanied by changes in specific E3 ligases. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41(4):669–79.
54. Conraads VM, Vrints CJ, Rodrigus IE, et al. Depressed expression of MuRF1 and MAFbx in areas remote of recent myocardial infarction: a mechanism contributing to myocardial remodeling? *Basic Res Cardiol* 2010;105(2):219–26.
55. Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, et al. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem* 2001;276(32):30057–63.
56. Sitte N, Huber M, Grune T, et al. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2000;14(11):1490–8.
57. Tsukamoto O, Minamino T, Okada K, et al. Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340(4):1125–33.
58. Saelens X, Festjens N, Walle LV, Gurr M van, Loo G van, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23(16):2861–74.

**9 Abkürzungsverzeichnis**

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
DCM	<i>Dilated cardiomyopathy</i> , dilatative Kardiomyopathie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICM	<i>Ischemic cardiomyopathy</i> , ischämische Kardiomyopathie
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
LVAD	<i>Left-ventricular-assist device</i> , Linksventrikuläres Unterstützungssystem
MAFbx	<i>Muscle atrophy F-box</i>
MuRF-1	<i>Muscle RING-finger protein-1</i>
n	Anzahl der Experimente
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered Saline-Tween® 20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

**10      Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Einteilung der Kardiomyopathieformen	3
Abb. 2: Einteilung des Remodelings in eine frühe und in eine späte Phase.	7
Abb. 3: Die einzelnen Komponenten eines Proteasoms	10
Abb. 4: Schematische Übersicht der verschiedenen Ubiquitinierungsarten.	11
Abb. 5: Beispielhafte LVAD-Anlage	24
Abb. 6: Morrow-Resektion	25
Abb. 7: Schematischer Aufbau der Blot-Apparatur	29
Abb. 8: Western-Blot-Analyse des Translationsfaktors eIF4E	35
Abb. 9: Bestimmung der proteasomalen Aktivität	37
Abb. 10: Western-Blot-Analyse der E3-Ligase <i>Muscle atrophy F-box</i> (MAFbx)	38
Abb. 11: Western-Blot-Analyse der E3-Ligase <i>Muscle RING-finger protein-1</i> (MuRF-1)	39
Abb. 12: Histologische Analyse der Ubiquitin-Expression	40
Abb. 13: Histologische Analyse der Ubiquitin- und der Ubiquitin-Depots	41
Abb. 14: Western-Blot-Analyse von Multi-Ubiquitin	42
Abb. 15: Western-Blot-Analyse von K48-Proteinubiquitinierungen	43
Abb. 16: Western-Blot-Analyse von K63-Proteinubiquitinierungen	44
Abb. 17: Vergleich der NADPH-Oxidase-Aktivität	45
Abb. 18: Histologische Analyse der AIF-Expression in humanem Myokard	46
Abb. 19: Histologische Analyse der AIF-Expression in humanem Myokard	47

**11 Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Geräte	15
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien	16
Tab. 3: Chemikalien und kommerzielle Kits	17
Tab. 4: Primärantikörper, Immunhistologie und Western-Blots	18
Tab. 5: Sekundärantikörper, Immunhistologie und Western-Blots	18
Tab. 6: Primärantikörper und Sekundärantikörper, Western-Blot	19
Tab. 7: Primärantikörper mit Sekundärantikörper, Immunhistologie	19
Tab. 8: Puffer und Lösungen	20
Tab. 9: Standardrezepturen für Trenn- bzw. Sammelgele	22
Tab. 10: Software	22
Tab. 11: Verdünnungsreihe Proteinkonzentrationsbestimmung	27
Tab. 12: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	48

## **Eigenständigkeitserklärung**

### **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

---

Ort, Datum

---

Kristina Kellermann

## **Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Michael Borger für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung dieses interessanten Themas bedanken.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern und Doktoranden des Forschungslabors der Herzchirurgie und auch der Kardiologie, durch die die Arbeit im Labor immer auch mit viel Freude und Spaß verbunden war. Besonders Sabine Spänig danke ich auch für die Einarbeitung in den methodischen Teil dieser Arbeit.

Ein ganz besonders großer Dank gilt Dr. Maja-Theresa Dieterlen. Mit ihrem Enthusiasmus und ihrer Diskussions- und Gesprächsbereitschaft hat sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Zuletzt möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die durch ihren Rückhalt bei der Entstehung dieser Arbeit geholfen haben. Meiner Familie danke ich sehr für ihre ständige, auch über diese Arbeit hinausgehende Unterstützung. Meine lieben Eltern und Oma und Opa haben es mir überhaupt erst ermöglicht diesen Weg zu gehen.